

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN LA COVID-19: INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS HUÉSPED INFECTADAS, EL SARS-COV2 Y POSIBLES DIANAS TERAPÉUTICAS

Jose María Tordera Mora

**MÁSTER OFICIAL DE BIOESTADÍSTICA Y
BIOINFORMÁTICA (UOC-UB)**

**ÁREA 2 SUBÁREA 8.- BIOINFORMÁTICA Y PROTEÓMICA EN VIRULENCIA Y
ENFERMEDADES HUMANAS**

**Luis Franco Serrano
Marc Maceira Duch**

05/06/2021



Esta obra está sujeta a una licencia de
Reconocimiento-NoComercial-
SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

Licencias alternativas (elegir alguna de las siguientes y sustituir la de la página anterior)

A) Creative Commons:



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-CompartirIgual [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento [3.0 España de Creative Commons](#)

B) GNU Free Documentation License (GNU FDL)

Copyright © 2021 Jose María Tordera Mora

Permission is granted to copy, distribute and/or modify this document under the terms of the GNU Free Documentation License, Version 1.3 or any later version published by the Free Software Foundation; with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts.

A copy of the license is included in the section entitled "GNU Free Documentation License".

C) Copyright

© Jose María Tordera Mora

Reservados todos los derechos. Está prohibido la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la impresión, la reprografía, el microfilme, el tratamiento informático o cualquier otro sistema, así como la distribución de ejemplares mediante alquiler y préstamo, sin la autorización escrita del autor o de los límites que autorice la Ley de Propiedad Intelectual)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Análisis bioinformático de la expresión proteica en la COVID-19: interacción entre las células huésped infectadas, el SARS-CoV2 y posibles dianas terapéuticas</i>
Nombre del autor:	<i>Jose María Tordera Mora</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Luis Franco Serrano</i>
Nombre del PRA:	<i>Marc Maceira Duch</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	06/2021
Titulación:	<i>Máster Universitario en Bioinformática y Bioestadística UOC-UB</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Área 2. Subárea 8: Bioinformática y proteómica en virulencia y enfermedades humanas</i>
Idioma del trabajo:	<i>Castellano</i>
Número de créditos:	15
Palabras clave	<i>Coronavirus; Proteómica; neumocito tipo 2; inmunidad innata; linfocito T;</i>
<p>Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i></p>	
<p>La pandemia COVID-19 ha supuesto un fuerte impacto para los sistemas sociosanitarios, además de un nuevo reto para la comunidad científica en el estudio del nuevo SARS-CoV2 y su interacción con el huésped humano. La presencia de modelos de infecciones virales previas como las del SARS-CoV1 y el MERS ha permitido establecer comparaciones a nivel de sus proteínas, fundamentalmente con algunos elementos de la proteína S Spike, capaz de establecer comunicación con los receptores de membrana de las células diana del huésped y activar el ciclo infectivo viral. La homología observada en la secuencia de algunas subunidades de dicha proteína entre los SARS-CoV y la predicción de potenciales regiones de epítopos similares en los tres virus han centrado el estudio de la fisiopatología de la enfermedad en la interacción entre el virus y las células huésped. Además del receptor ACE2 se han descrito formas alternativas de interacción virus-huésped como CD147 o CD26/DPP-4 y se ha estudiado la capacidad del huésped para activar la proteína S mediante diferentes proteasas para facilitar la entrada del virus. También se han descrito proteínas multifuncionales en el virus y el huésped que pueden potenciar diversas respuestas inmunológicas según la función que adopten. La diferente proporción y combinación en la expresión proteica de los receptores y proteasas tanto en células epiteliales del sistema respiratorio como en el sistema inmunitario, tal como señalan los estudios de expresión proteica en modelos celulares in vitro, puede ser clave</p>	

para definir endotipos y fenotipos de pacientes, con potenciales implicaciones clínico-terapéuticas.

Abstract (in English, 250 words or less):

The COVID-19 pandemic has deeply impacted the sociosanitary healthcare systems as well as becoming a new challenge for the scientific community in terms of research about SARS-CoV2 and its interplay with the human host. The existence of previous viral infectious models like SARS-CoV1 and MERS has enabled making comparisons from a protein level, mainly with some components of the Spike S protein, a protein capable of establishing communication with host cell membrane receptors and activating the viral infective cycle. The encountered homology in the sequence of some S protein subunits among the SARS-CoV as well as the prediction of similar potential epitope regions in the three viruses has focused the physiopathological research of the disease in the interaction between the virus and host cells. Not only ACE2 receptor but other alternative ways of interaction such as CD147 and CD26/DPP-4 have been described. Also has been analyzed the host cell ability to activate the S protein through different proteases, making possible the viral entry. It is noteworthy the description of multifunctional proteins in the virus and host cells that may enhance immune responses according to the function being adopted. The different proportion and combination in the protein expression of the receptors and proteases in the epithelial airway cells and in the immune system, as noted in the protein expression studies from in vitro cellular models, could be detrimental to better define the endotypes and phenotypes of patients, with potential clinical and therapeutic repercussions.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	6
2.	INTRODUCCIÓN	7
2.1.	CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE MÁSTER	7
2.2.	OBJETIVOS DEL TRABAJO FINAL DE MÁSTER	7
2.2.1.	OBJETIVOS GENERALES	7
2.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
2.3.	ENFOQUE Y MÉTODO A SEGUIR	8
2.4.	PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO	9
2.5.	RESULTADOS ESPERADOS	11
2.6.	BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS OTROS CAPÍTULOS DE LA MEMORIA	11
3.	ESTADO DEL ARTE	12
3.1.	INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	12
3.2.	DESCRIPCIÓN DEL MARCO CLÍNICO Y EVOLUCION	13
3.3.	DESCRIPCION DEL VIRUS Y COMPARACION DEL PROTEOMA ENTRE SARS-COV _s Y MERS	
3.3.1.	PROTEÍNA SPIKE (S)	16
3.3.2.	EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR (RBD)	18
3.3.3.	ARN POLIMERASA ARN-DEPENDIENTE (RDRP)	18
3.3.4.	PROTEASA VÍRICA	19
3.4.	DESCRIPCION DE LAS FORMAS DE INTERACCION QUE PRESENTA EL VIRUS	19
3.4.1.	COMPLEJO RBD-ACE2	20
3.4.2.	PROTEASAS DE LAS CÉLULAS HUÉSPED	22
3.4.3.	CATEPSINAS	23
3.4.4.	EL RECEPTOR DE MEMBRANA CD147 (BASIGINA)	23
3.5.	DESCRIPCIÓN DEL MARCO INMUNOLÓGICO	24
3.5.1.	GRANULOCITOS	24
3.5.2.	MACRÓFAGO ALVEOLAR	25
3.5.3.	LINFOCITOS	25
3.5.4.	CÉLULAS NATURAL KILLER	26
4.	METODOLOGÍA	27
5.	RESULTADOS	29
5.1.	COMPARACIÓN DE LOS PROTEOMAS ENTRE SARS-COV ₂ , SARS-COV Y MERS	29
5.2.	INMUNOGENICIDAD DE LA PROTEINA S SPIKE	31
5.3.	MULTIFUNCIONALIDAD DEL PROTEOMA: PROTEÍNAS MOONLIGHTING Y SARS-COV ₂	39
5.4.	DESCRIPCIÓN DEL PROTEOMA EXTRACELULAR	44
5.5.	DESCRIPCION DEL PROTEOMA DE LAS PRINCIPALES CELULAS INFECTADAS	45
5.5.1.	NEUMOCITO TIPO 1	45
5.5.2.	NEUMOCITO TIPO 2	47
5.5.3.	GRANULOCITOS	49
5.5.4.	MACROFAGO ALVEOLAR	51
5.5.5.	LINFOCITOS	53
5.5.6.	CELULAS NATURAL KILLER	55
5.5.7.	FIBROBLASTOS	56
5.6.	DESCRIPCIÓN Y COMPARACION DEL PROTEOMA DE LOS MODELOS CELULARES EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS	57
6.	DISCUSION	61
7.	CONCLUSIONES	69
8.	BIBLIOGRAFÍA	71
9.	ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Gantt con la planificación integral del trabajo -----	11
Figura 2. Fases clínicas de la COVID19 junto con los síntomas y signos clínicos característicos -----	14
Figura 3. Genoma del SARS-CoV2 -----	16
Figura 4. Esquema de las proteínas estructurales del SARS-CoV2 -----	17
Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína Spike (S) vista de frente y vista desde la región inferior con el sitio de unión -----	18
Figura 6. Interacciones de la SPIKE_SARS2 con algunas proteínas expresadas en células humanas -----	20
Figura 7. A) Estructura general del complejo RBD-ACE2. B) Interacciones diferentes entre el RBD del SARS-CoV2 y la ACE2 -----	21
Figura 8. Región de interés del alineamiento global múltiple de la proteína S Spike entre MERS, SARS-CoV2 y SARS-CoV -----	22
Figura 9. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de la proteína Spike -----	29
Figura 10. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW del fragmento S2 de la Spike Protein -----	29
Figura 11. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW del RBD --	30
Figura 12. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de la RdRp - -----	31
Figura 13. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de la proteasa viral -----	31
Figura 14. Análisis mediante Bepipred de las regiones dentro de la secuencia polipeptídica del RBD de los 3 coronavirus -----	33
Figura 15. Análisis mediante Bepipred de las regiones dentro de la secuencia polipeptídica del fragmento S2 de los 3 coronavirus -----	36
Figura 16. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de los segmentos antigénicos marcados en la secuencia del fragmento S2 en los 3 coronavirus -----	37
Figura 17. Análisis mediante Bepipred de las regiones dentro de la secuencia polipeptídica del fragmento S1 de los 3 coronavirus -----	39
Figura 18. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de los segmentos antigénicos marcados en la secuencia del fragmento S1 en los 3 coronavirus -----	40
Figura 19. Expresión de mRNA de ACE2 en el tejido pulmonar -----	48
Figura 20. Expresión de mRNA de TMPRSS2 en el tejido pulmonar -----	48
Figura 21. Esquema del alveolo con los diversos tipos celulares -----	52
Figura 22. Descripción del papel jugado por CyPA en la vía de señalización del NFAT y la replicación de los coronavirus -----	54
Figura 22. Papel destacado de las células NK en la COVID-19 -----	55
Figura 23. Cambios traducionales en la célula huésped después de la infección por SARS-CoV2 -----	58
Figura 24. Análisis del reactoma del cluster de proteínas sobreexpresadas después de la infección por SARS-CoV2 -----	58

Figura 25. Perfiles de expresión proteica de las cuatro principales líneas celulares empleadas en el estudio de la infección por SARS-CoV2 -----	59
Figura 26. Proteoma de Vero E6 tras la infección por SARS-CoV2 -----	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de riesgos y estrategias de afrontación -----	11
Tabla 2. Lista de documentos de entrega -----	11
Tabla 3. Afectación multisistémica en la COVID19 -----	15
Tabla 4. Terapias empleadas en la COVID19 -----	15
Tabla 5. Proteínas expresadas por el SARS-CoV2 obtenidas gracias a la plataforma Uniprot junto con la anotación GO (Gene Ontology) -----	41
Tabla 6. Proteínas moonlighting expresadas por las células huésped obtenidas gracias a la plataforma Uniprot junto con la anotación GO (Gene Ontology) -----	46
Tabla 7. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los neumocitos tipo 1 y células epiteliales bronquiales -----	46
Tabla 8. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los neumocitos tipo 2 -----	49
Tabla 9. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los granulocitos pulmonares -----	51
Tabla 10. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los macrófagos alveolares -----	53

1. RESUMEN

ANTECEDENTES

La pandemia de la COVID-19 ha supuesto un fuerte impacto sobre los sistemas sociosanitarios y el enfrentamiento frente al nuevo agente infeccioso desconocido SARS-CoV2, del que la comunidad científica conoce cada vez más su estructura y fisiopatología. Entre todo ello destaca la comunicación con el huésped que le facilita su proteína S en superficie. La afinidad de dicha proteína con diferentes receptores de membrana expresados en las células huésped y el modo de activación define el tropismo del virus y es clave en la respuesta inmunológica ejercida. El estudio de estas interacciones puede tener implicaciones pronósticas y terapéuticas en la enfermedad.

MÉTODOS

La identificación y el estudio de la secuencia de la proteína S y otras proteínas virales mediante comparación con otros virus previos conocidos (SARS-CoV y MERS) se realizó mediante las herramientas bioinformáticas Uniprot y ClustalW respectivamente. El análisis de potenciales dianas del sistema inmune en la proteína S se realizó mediante Bepipred. El estudio de las funciones diversas de las proteínas del SARS-CoV2 y del huésped fue posible gracias a Uniprot. Por último, el estudio de la expresión proteica de las células huésped se realizó gracias a The Human Protein Atlas.

RESULTADOS

El análisis de la proteína S reveló homologías entre SARS-CoV1 y SARS-CoV2 y menor conservación en el MERS. Al estudiar la presencia de epítomos en algunos segmentos de la proteína no hubo diferencias en los tres virus en la caracterización y exposición de los mismos, con mayor conservación de los segmentos de SARS-CoV1 y SARS-CoV2.

El estudio de las proteínas del SARS-CoV2 y del huésped mostró multifuncionalidad respectivamente en al menos cuatro y seis proteínas.

Al estudiar la expresión proteica en las células huésped se observó que las células epiteliales respiratorias y del sistema inmune expresaban en diferente proporción y combinación receptores de membrana ACE2, CD147 y CD26/DPP-4, y por otro lado proteasas como TMPRSS2, TMPRSS4, FURIN, catepsinas, ADAM17 y PADs, entre otras.

El estudio con modelos celulares in vitro corroboró los hallazgos y señaló a reguladores de la transcripción, inhibidores de proteasas y receptores de membrana como proteínas significativamente expresadas.

CONCLUSIONES

Los hallazgos de una cierta homología de la proteína S y de epítomos similares entre los SARS-CoV hacen centrar las sospechas del devenir de la COVID-19 en la interacción entre el virus y el huésped definiendo la evolución clínica por la expresión proteica del huésped, con potenciales implicaciones pronósticas y terapéuticas.

APORTACIÓN

El trabajo ha querido centrar el foco no sólo en los receptores de membrana del huésped sino también en las proteasas responsables de la activación de la proteína S, cuya expresión diferencial puede definir fenotipos de pacientes infectados.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Contexto y justificación del Trabajo Final de Máster

La situación actual de pandemia por COVID19 ha motivado a la comunidad científica en la búsqueda de una explicación biológica e inmunológica de la interacción entre el nuevo SARS-CoV2 y las células huésped humanas. La capacidad viral de utilizar la maquinaria genética celular para sintetizar nuevas partículas virales se ha visto demostrada mediante estudios en modelos celulares de los cambios provocados en la expresión proteica de las células infectadas. La presencia de moléculas de superficie en el SARS-CoV2 le permite establecer una comunicación con las células huésped y favorece la entrada del virus en ellas.

Una vez en el interior el ciclo de replicación viral se pone en marcha gracias al uso vírico de las fábricas ribosómicas del huésped para sintetizar proteínas virales. En el citoplasma se produce el ensamblaje de las partículas virales y posteriormente la liberación de los virus maduros, agotando energéticamente al huésped y causándole la muerte. Pese a los datos esperanzadores mostrados en los ensayos realizados con diferentes vacunas, la ausencia de fármacos antivirales con eficacia demostrada para controlar la infección constituye un estímulo para la ciencia para encontrar dianas terapéuticas para cortar el ciclo replicativo viral.

En el Trabajo Fin de Máster que desarrollamos con el título “Análisis bioinformático de la expresión proteica en la COVID-19: interacción entre las células huésped infectadas, el SARS-CoV2 y posibles dianas terapéuticas” hemos intentado encontrar patrones de expresión proteica que permitan explicar mejor los cambios a nivel proteómico en el huésped infectado por SARS-CoV2. De esta forma se pueden proponer algunas dianas terapéuticas para poder investigar en fármacos antivirales que accidenten el ciclo replicativo viral y en fármacos inmunomoduladores que eviten los efectos deletéreos tisulares de la respuesta inmunológica antiviral.

2.2 Objetivos del Trabajo Final de Máster

A) Objetivos generales

El objetivo general de este Trabajo Final de Máster es el siguiente:

- 1) Analizar desde el punto de vista bioinformático las proteínas expresadas por los virus del género Betacoronavirus y por las principales células huésped diana para explicar el proceso fisiopatológico de estos microorganismos.

B) Objetivos específicos

- 1) Señalar y describir los principales factores de virulencia en relación con el proteoma de los virus del género Betacoronavirus.
- 2) Comparar la expresión y estructuras proteicas de los diferentes virus del género Betacoronavirus.
- 3) Describir las formas de interacción que presenta el SARS-CoV2 con las células diana.
- 4) Comparar la expresión y estructuras proteicas de las principales células diana infectadas.
- 5) Identificar proteínas multifuncionales en relación con la infección por SARS-CoV2.

2.3 Enfoque y método a seguir

Para cumplimentar los objetivos señalados en el anterior apartado hemos estudiado la estructura vírica de los virus del género Betacoronavirus en la literatura biomédica que aparece en la bibliografía del trabajo. Hemos destacado las proteínas virales más influyentes en el ciclo replicativo viral y hemos comparado en el género Betacoronavirus la secuencia de aminoácidos y estructura mediante alineamientos estructurales con ClustalW.

En el proceso replicativo viral hemos descrito las interacciones bioquímicas y enlaces posibles que se establecen entre las moléculas de membrana del SARS-CoV2 y los receptores de las células huésped. También hemos intentado estudiar los principales antígenos virales que catalizan la respuesta inmunológica que organiza el sistema inmune innato y adaptativo. Esto ha sido posible mediante algunas herramientas bioinformáticas que vienen detalladas en el apartado métodos.

También ha sido fundamental determinar la expresión proteica más destacada en las células huésped diana para la infección por SARS-CoV2, dando especial importancia a la expresión de los receptores de membrana

para la unión del SARS-CoV2 como son la ACE2 y otros receptores menos conocidos. Dicha expresión la hemos estudiado mediante algunas herramientas informáticas como The Human Proteome Atlas y Gene Ontology. Por otro lado hemos recurrido a los cambios provocados en los modelos celulares consultados en la bibliografía para observar cuáles son las proteínas que ven más modificada su expresión. Dichos cambios también se han analizado con herramientas bioinformáticas que especificamos en el apartado de métodos.

2.4 Planificación del Trabajo

Se ha establecido una planificación del trabajo dividiendo cada objetivo en diversas tareas. Estas tareas se han especificado y cumplimentado de forma organizada repartiéndolas en dos fases del proyecto (PEC2 y PEC3). En la primera fase se ha realizado una búsqueda bibliográfica sistemática tanto del proteoma del SARS-CoV2 como de las principales proteínas expresadas en las células huésped humanas infectadas, así como las proteínas de interacción. Se han enumerado y descrito las proteínas estructurales y no estructurales del SARS-CoV2 más destacadas para realizar el análisis comparativo a posteriori. También se han enumerado y descrito aquellas proteínas expresadas también por las células huésped.

En la segunda fase del trabajo se ha realizado el análisis comparativo entre las proteínas del SARS-CoV2 y el resto de betacoronavirus. También se ha realizado un análisis comparativo de las proteínas expresadas entre los diferentes huéspedes infectados y también con respecto a los modelos celulares in vitro. Esta fase también ha servido para redactar la memoria del trabajo.

La planificación integral del trabajo se adjunta a continuación mediante Diagrama de Gantt. Se ha realizado un desglose de objetivos en tareas y se les ha asignado una duración que termina en el hito de entrega de la práctica.

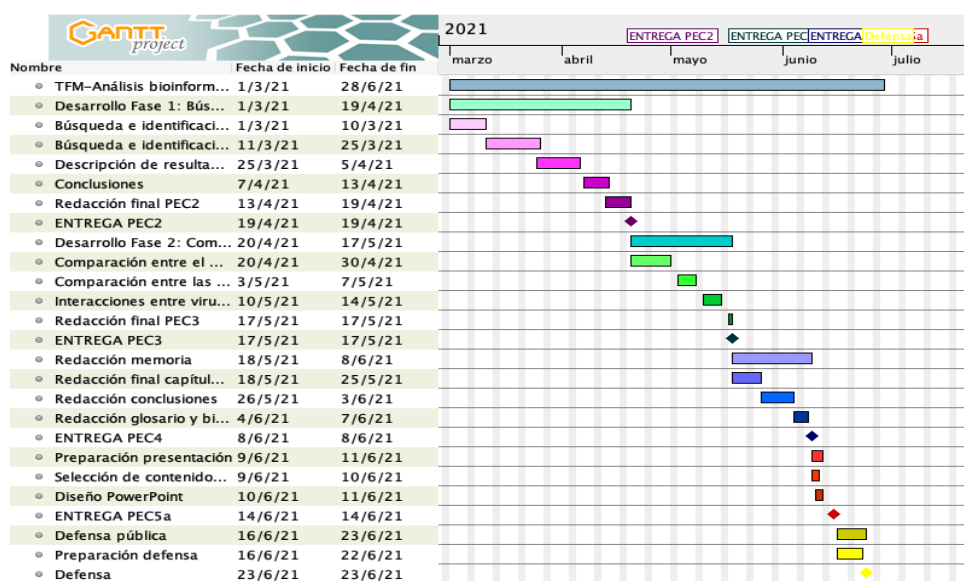


Figura 1. Diagrama de Gantt con la planificación integral del trabajo

En este sentido, tras realizar la planificación hemos realizado un análisis de riesgos mientras que definíamos estrategias para poder afrontarlos:

Tabla 1. Lista de riesgos y estrategias de afrontación

PEC	DESCRIPCIÓN RIESGO	ESTRATEGIA
PEC2 fase 1	Imposibilidad de identificar y caracterizar todas las proteínas del SARS-CoV2 y de las células huésped	Ser selectivos en la selección de las proteínas más implicadas en la fisiopatología de la COVID19
PEC2 fase 2	Uso erróneo de las herramientas bioinformáticas para la comparación de los proteomas	Aprendizaje en el uso de las herramientas bajo la guía del tutor del TFM (Dr Franco) y el estudio de los manuales de uso.
PEC3	Memoria imprecisa o excesivamente detallista	Adecuación a los criterios de extensión recomendados y al tiempo indicado en la planificación
PEC4	Selección inadecuada de contenidos para la realización del PowerPoint	Adaptar contenidos a las exigencias de la defensa del proyecto.

PEC5	Errores en la comunicación del proyecto	Ser capaz de transmitir de forma clara, concreta y entretenida las claves de este proyecto.
-------------	---	---

2.5 Resultados esperados

Los documentos de entrega que vamos a relacionar con este Trabajo Final de Máster son los siguientes:

Tabla 2. Lista de documentos de entrega

DOCUMENTO	NOMBRE	DESCRIPCIÓN
PEC1	Plan de trabajo	Define los objetivos, planificación temporal de tareas y entregables previstos.
PEC2 PEC3	Avance del proyecto fase 1 Avance del proyecto fase 2	Desarrolla las fases del proyecto valorando la consecución de los objetivos desarrollados.
PEC4	Memoria	Muestra la metodología empleada y los resultados obtenidos para cada objetivo.
PEC5	Presentación	Presentación de objetivos fijados, metodología de análisis empleada y resultados. Apartado final de conclusiones para el cierre de la presentación
PEC6	Defensa	Presentación de los resultados obtenidos y conclusiones.

2.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

La primera parte de los capítulos del trabajo consiste en una introducción de la situación histórica relacionada con la COVID19, descripción del marco clínico y evolución de las estrategias terapéuticas utilizadas hasta la fecha actual.

La segunda parte ha comprendido la descripción de la biología molecular de los Betacoronavirus, incidiendo fundamentalmente en las diferencias proteómicas entre MERS, SARS y SARS-CoV2. También se han descrito las formas de interacción que presentan estos virus con las células huésped.

En la tercera parte la descripción se ha realizado desde la perspectiva de las principales células huésped infectadas y de los modelos celulares utilizados para estudiar in vitro la infección por SARS-CoV2. La descripción se ha centrado en las diferencias en la expresión proteica de las células infectadas.

En la cuarta parte se ha realizado una comparación de los proteomas tanto de los diferentes betacoronavirus y las células huésped infectadas para intentar detectar algunas diferencias significativas y poder sugerir algunas dianas terapéuticas para el futuro.

La última parte del trabajo recoge las conclusiones más interesantes que se han podido extraer y plantea posible escenario nuevo para investigar en el futuro más próximo.

3. ESTADO DE ARTE

3.1 INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

En Diciembre de 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa sobre un brote epidémico de neumonía en Wuhan, en la provincia de Hubei (China), cuya etiología estaba sin identificar. El 30 de enero de 2020 la OMS declara el estado de pandemia a raíz de la expansión de dichos casos, los cuales se relacionaban, tras realizar análisis de secuenciación masiva en el laboratorio, con un nuevo coronavirus llamado SARS-CoV2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) dentro del género *Betacoronaviridae* [1]. El 11 de Febrero de 2020 la OMS denomina de manera oficial a la enfermedad provocada por el SARS-CoV2 como COVID-19 (Coronavirus Disease 2019).

La COVID-19 parece tener su causa en la venta de animales salvajes vivos en el mercado de alimentos de Wuhan. Estos animales se cree que son los huéspedes intermediario del virus teniendo su origen en los murciélagos del género *Rhinolophus* [2]. Aunque se conocen los principales factores epidemiológicos responsables de la expansión del virus [3] y también la

respuesta inmunológica frente al mismo, actualmente sigue sin identificarse el huésped intermediario.

Esta enfermedad demostró altas tasas de contagiosidad [4,5] y de letalidad [6]. Los datos recibidos por la OMS de parte de los estados a fecha de Octubre 2020 han mostrado al menos 37 millones de casos confirmados con COVID-19 y 1 millón de muertes. De forma global, los Estados Unidos, India y Brasil son los tres países con el mayor número de casos a nivel mundial [7]. Después de la aparición de los brotes epidémicos por SARS-CoV1 y MERS-CoV, SARS-CoV2 es el tercer coronavirus humano de transmisión zoonótica en lo que llevamos de siglo [8]. Mientras que las epidemias por SARS-CoV1 (2002/2003) y MERS-CoV (2012) tuvieron tasas de mortalidad del 10% y del 36% respectivamente [9,10], se mantuvo una ubicación geográfica delimitada con solamente 8098 y 2494 infecciones demostradas [11,12]. El SARS-CoV2 presentó una tasa de letalidad menor que el SARS-CoV1 y el MERS aunque con mayor capacidad de contagio [10].

Desde la declaración de pandemia se han realizado múltiples ensayos clínicos con numerosos fármacos, algunos de ellos empleados con anterioridad para tratar la infección por SARS-CoV1 de la que se conocían datos previamente. Otros tratamientos con empleados han sido los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina ECA (IECAs), corticoides, ibuprofeno e incluso hierbas medicinales chinas [3,13,14]. También se ha investigado sobre el uso de agentes antivirales y fármacos moduladores de la respuesta inmunológica [13]. Por otro lado el estudio de dianas terapéuticas del SARS-CoV2, principalmente proteínas estructurales y no estructurales del virus, ha permitido el desarrollo de las vacunas para frenar la evolución hacia las formas más graves de la enfermedad.

El estudio de la expresión proteica del SARS-CoV2 y de la influencia del mismo sobre la expresión proteica de las células huésped infectadas puede permitir conocer la manera en la que interactúa el SARS-CoV2 con el organismo humano. Del mismo modo podrá explicar las diferencias interindividuales en la respuesta inmunológica que se ha desarrollado tras la infección y señalar algunas de las potenciales dianas farmacológicas para disminuir los datos de mortalidad asociada a la infección.

3.2 DESCRIPCIÓN DEL MARCO CLÍNICO Y EVOLUCION

La COVID-19 se puede dividir en tres niveles clínicos de afectación en función de la severidad de la enfermedad: leve, grave y crítica. La gran

mayoría de los pacientes presentan síntomas leves, pero también se han notificado casos de infección asintomática [15].

La puerta de entrada del SARS-CoV2 es el epitelio de la vía respiratoria superior mediante la transmisión aérea a través de gotículas presentes en el aire que contienen partículas víricas. La infección en la mayor parte de los casos se resuelve sin mayores consecuencias para el individuo, pero en algunos casos se produce la afectación de la vía respiratoria inferior y del parénquima pulmonar provocando una neumonía dada la inflamación local generada por la respuesta inmunitaria a cargo del sistema inmune innato en primera instancia y adaptativo en segunda.

La curso clínico de la infección por SARS-CoV2 se ha descrito en múltiples artículos de revisión [16-19]. Normalmente el período de replicación acontece durante los primeros 5-7 días desde el contagio por el SARS-CoV2, fase que se ha denominado como de respuesta viral. Posteriormente acontece una fase pulmonar donde se entremezcla la fase replicativa viral con la fase de respuesta inflamatoria que será predominante en un tercer estadio donde predomina el fracaso de múltiples órganos (figura 2).

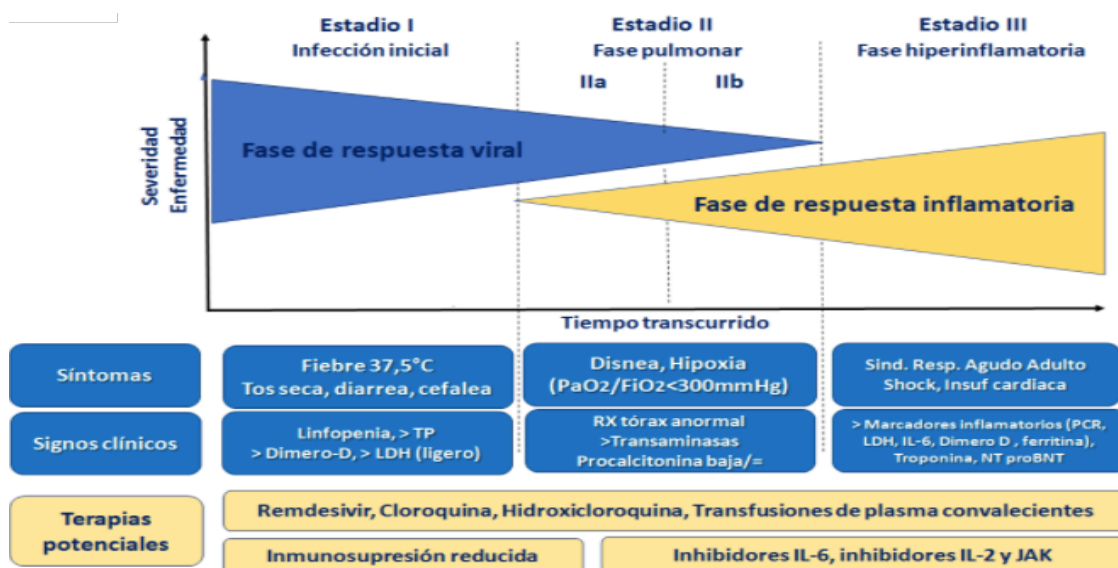


Figura 2. Fases clínicas de la COVID19 junto con los síntomas y signos clínicos característicos. Adaptado de Siddiqi y cols. J Heart Lung Transplant. 2020

Aunque la afectación predominante e inicial es la del tejido pulmonar, la experiencia clínica adquirida durante el tiempo de pandemia ha podido comprobar que la afectación es multisistémica. La tabla 3 recoge

un resumen de algunas de las más destacas manifestaciones a nivel extrapulmonar.

Tabla 3. Afectación multisistémica en la COVID19 [19-21]

OJOS	Conjuntivitis, conjuntivitis hemorrágica con pseudomembranas
TIROIDES	Tiroiditis subaguda, daño celular folicular y parafolicular
RENAL	Daño tubular agudo, glomerulonefritis, glomeruloesclerosis, podocitopatías.
SEMINAL	Daño en las células de Sertoli, orquiepididimitis
CARDIOVASCULAR	Miocarditis, pericarditis, derrame pericárdico, vasculitis
NERVIOSO	Meningoencefalitis, accidentes cerebrovasculares, neuropatías periféricas desmielinizantes.
GASTROINTESTINAL	Gastritis, colitis inflamatoria y hemorrágica, diarrea inflamatoria, esteatosis micro y macrovesicular hepática, pancreatitis

Por otro lado, en función del tiempo transcurrido de enfermedad se han ensayado múltiples terapias farmacológicas, todas ellas dirigidas en 2 sentidos fundamentales: el proceso replicativo viral y la respuesta inflamatoria incontrolada del huésped. Aunque se trata de una temática que va más allá del presente trabajo se han seleccionado algunas de dichas terapias hasta la fecha empleadas y se ha realizado una clasificación en función de si la intención era el control del ciclo replicativo del SARS-CoV2 o la regulación del proceso inflamatorio del huésped (tabla 4).

Tabla 4. Terapias empleadas en la COVID19

SARS-CoV2	HUÉSPED
Lopinavir/Ritonavir (Kaletra®)	Corticoides (Dexametasona, metilprednisolona, prednisona)
Remdesivir	Hidroxiclороquina
Faripiravir	Baricitinib
Interferón beta-1b	Tocilizumab
	Azitromicina
	Anakinra

Queda fuera del análisis de nuestro Trabajo las diferentes vacunas de las que disponemos en la actualidad así como la composición de las mismas y los datos que hasta la fecha han recogido los ensayos clínicos acerca de su eficacia a corto, medio y largo plazo en la generación de inmunidad en el huésped.

3.3 DESCRIPCION DEL VIRUS Y COMPARACION DEL PROTEOMA DE SARS-COV Y MERS

Los coronavirus pertenecen a la subfamilia *Coronavirinae*, dentro de la familia de *Coronaviridae*. Dicha subfamilia se compone de cuatro generaciones: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Los coronavirus que afectan al ser humano son los de los géneros *Alpha-* y *Betacoronavirus*.

El genoma de los CoV consiste en un ARN de cadena simple (ssRNA), de mayor longitud respecto al resto de virus ARN conocidos. Los fragmentos de lectura (ORF -*Open Reading Frames*-) del genoma del SARS-CoV2 se dividen en ORF1a y ORF1b, codificando dos poliproteínas pp1a/pp1ab que son procesadas por una proteasa vírica dando lugar a 16 proteínas víricas no estructurales (nsp1-16) y a la formación del complejo replicasa-transcriptasa (RTC), indispensable en la replicación viral (figura 2). El resto de los fragmentos codifican las proteínas estructurales víricas (figura 3): S (Spike protein), E (Envelope protein), M (Membrane protein) y N (Nucleocapsid protein); y, por otro lado, otras proteínas accesorias [22-24].

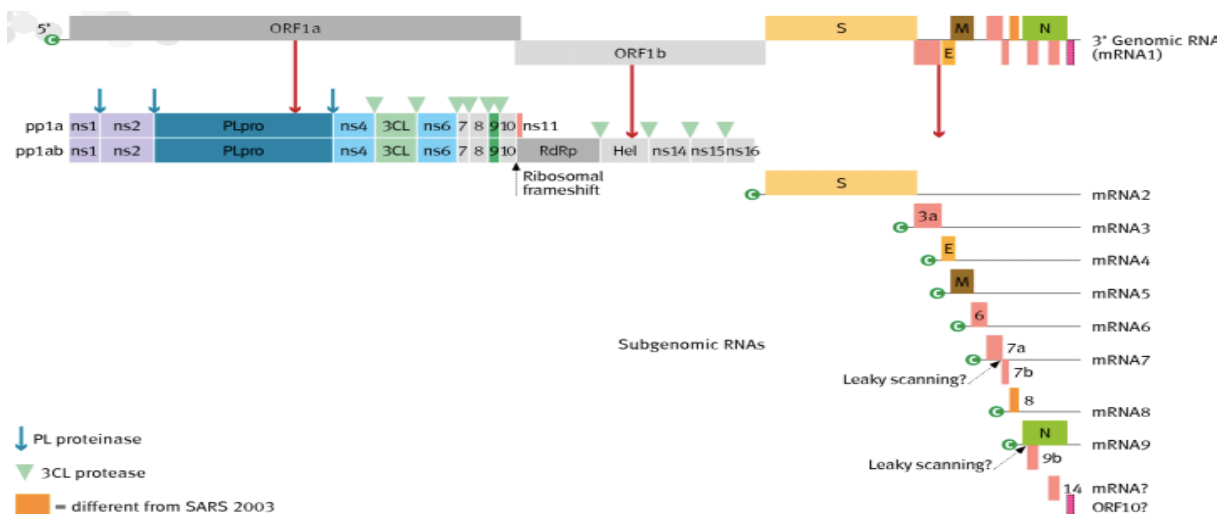


Figura 3. Genoma del SARS-CoV2. Tomado de ViralZone2020. SIB, Swiss Institute of Bioinformatics

Con respecto a las proteínas no estructurales se ha comprobado que Nsp1 participa en el procesamiento y replicación del RNA; Nsp2 modula las vías de señalización de supervivencia en la célula huésped; Nsp3 participa en la separación de las proteínas traducidas; Nsp4 contiene el dominio transmembrana tipo 2 (TM2) y modifica las membranas del retículo endoplásmico [25]; Nsp5 afecta al proceso de formación de poliproteínas durante la replicación; Nsp6 se asocia a un dominio transmembrana; Nsp7 y Nsp8 aumentan la afinidad del Nsp12 (que contiene la RNA polimerasa) por un cebador RNA; Nsp9 actúa como una proteína de unión al ssRNA; Nsp10 interviene en la metilación de la caperza de los ARNm virales; Nsp13 se une a ATP y a un dominio de zinc y participa en el proceso de replicación y transcripción; Nsp14, Nsp15 y Nsp16 dan lugar respectivamente a proteínas con función enzimática exorribonucleasa, endorribonucleasa y 2'-O-ribosa metiltransferasa. Uno de los estudios consultados [26] mostraba que algunas de estas proteínas Nsp entorpecían el mecanismo de *splicing* celular, traducción del mRNA y tráfico de proteínas hacia la membrana, dificultando la actividad de síntesis proteica de la célula huésped y, secundariamente, disminuyendo la capacidad de síntesis de interferones como mecanismo de defensa del huésped.

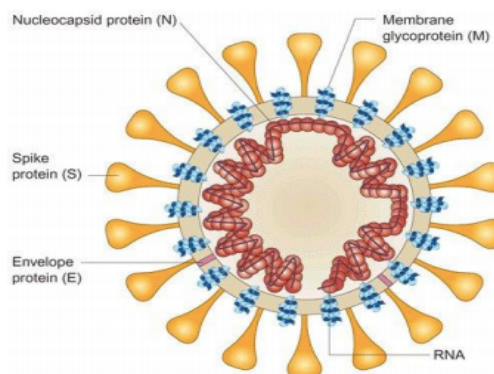


Figura 4. Esquema de las proteínas estructurales del SARS-CoV2 [24].

3.3.1 PROTEÍNA SPIKE (S)

La entrada de los coronavirus en las células huésped se produce gracias a la glicoproteína Spike [27]. Dicha proteína se compone de las subunidades funcionales S1 y S2. La subunidad S1 está formada por el dominio N-Terminal y el dominio de unión al receptor o RBD del inglés *Receptor Binding Domain*. La función de la subunidad S1 es la de unirse al receptor de la célula huésped. La subunidad S2 está formada por diferentes elementos: péptido de fusión (FP), *heptad repeat 1* (HR1), hélice central (CH), dominio de conexión (CD), *heptad repeat 2* (HR2), dominio

transmembrana (TM) y la cola citoplásmica (CT). La función de la subunidad S2 es la de permitir la fusión de membranas entre el virus y las células huésped. Existe una zona intercalada entre ambas subunidades (*S1/S2 protease cleavage site*) donde actúa una proteasa del huésped necesaria para permitir la ruptura y separación de ambas subunidades. De esta manera tienen lugar cambios conformacionales irreversibles que las activan para que el virus pueda penetrar en la célula huésped.

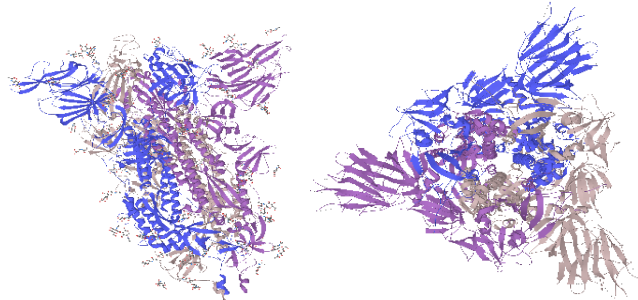


Figura 5. Estructura tridimensional de la proteína Spike (S) vista de frente y vista desde la región inferior con el sitio de unión. Extraído de <https://covid-19.uniprot.org/>

En general, la estructura de la proteína S en el SARS-CoV2 presenta similitudes a la del SARS-CoV, reconociendo ambas el receptor ACE2 en la membrana de las células huésped mediante el RBD. La proteína puede presentar dos formas estructurales que dan lugar al estado cerrado y al estado abierto. En este segundo estado el RBD queda expuesto en superficie para poder unirse al receptor ACE2 [28].

3.3.2 EL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR (RBD)

El RBD se compone de dos dominios estructurales: el núcleo y los subdominios externalizados. El núcleo se compone de cinco láminas β dispuestas de forma antiparalela y conectadas entre sí mediante hélices cortas y bucles. Entre las cadenas $\beta 4$ y $\beta 7$ dispuestas de forma antiparalela se dispone el *receptor-binding motif* (RBM), que contiene la mayoría de los sitios de unión del SARS-CoV2 al receptor ACE2. La exposición de este RBM en función de la disposición conformacional del RBD es la que permite hablar de un estado activo o “up” y uno inactivo o “down”.

3.3.3 ARN POLIMERASA ARN-DEPENDIENTE (RDRP)

La replicación del SARS-CoV2 depende de un complejo de replicación/transcripción compuesto por numerosas subunidades. El complejo se compone de proteínas virales no estructurales (nsp) y el núcleo

de dicho complejo es la RdRp en nsp12. Las funciones de la nsp12 dependen de factores accesorios como la nsp7 y la nsp8, pues la unión de estas proteínas permite aumentar la afinidad de la nsp12 por el cebador de RNA para comenzar el proceso de replicación/transcripción. Esta RdRp está conformada por tres subdominios que tienen la denominación de dedo, palma y pulgar. En el subdominio palma existen motivos A-G que forman el sitio activo para la actividad de la RdRp. En este sitio activo existe una zona para la entrada de la cadena molde, otro para la entrada del cebador, una zona para la entrada de los nucleótidos y otra para la salida de la hebra naciente [29].

3.3.4 PROTEASA VÍRICA

La proteasa principal (M^{pro}) del SARS-CoV2 juega un papel crucial en la replicación y transcripción del genoma viral. Como comentábamos anteriormente fragmenta la poliproteína pp1ab en al menos once sitios altamente conservados. M^{pro} forma un homodímero compuesto por dos protómeros (protómero A y protómero B). Cada protómero se compone de tres dominios (dominio 1, 2 y 3). El sitio activo de la M^{pro} se encuentra altamente conservado y contiene cuatro lugares: S1', S1, S2 y S4. En el S1' contiene un residuo thiol de una cisteína permite la unión de inhibidores potenciales de la M^{pro} [30].

3.4 DESCRIPCION DE LAS FORMAS DE INTERACCION QUE PRESENTA EL VIRUS

En este apartado se describen los principales medios que utiliza el SARS-CoV2 para interactuar con las células diana del huésped a las que va a infectar. Dicha interacción nace de los enlaces bioquímicos que se establecen fundamentalmente entre la proteína S de la superficie viral, receptores de membrana y proteasas que expresan las células diana. De entre los receptores el más conocido es el ACE2 [33], pero existen otras proteínas del huésped que pueden jugar un papel interesante en la patogénesis [34-39] como son TMPRSS2 (transmembrane protease serine-2) [34-36], ELANE (neutrophil elastase) [34], CTSL (cathepsin L) [37], ADAM17 [38] y el CD147 (extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer) [39].

En la figura 6 que se ha extraído de la herramienta UniProt [40] tras introducir el término SPIKE_SARS2 sirve para ilustrar y refrendar las

múltiples interacciones que se han descrito en experimentación básica con modelos celulares. Cuanto mayor número de experimentos demuestran que hay una interacción mayor es el grado de evidencia de que exista en la situación real del organismo, como sucede en el caso de ACE2, de BASI_HUMAN (CD147) o de la furina.

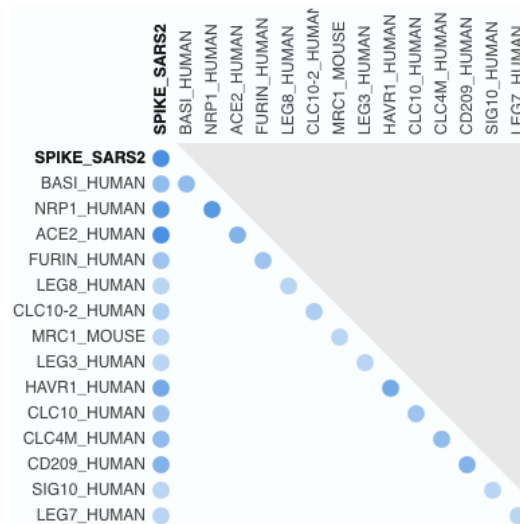


Figura 6. Obtenida de Uniprot.org. Interacciones de la SPIKE_SARS2 con algunas proteínas expresadas en células humanas.

3.4.1 COMPLEJO RBD-ACE2

La forma en la que el SARS-CoV2 reconoce el receptor determina la capacidad infectiva, la patogénesis y el grupo de células huésped susceptibles de ser infectadas. La combinación entre el RBD-ACE2 presenta similitudes desde el punto de vista fisiopatológico aunque con sutiles diferencias en el aspecto de las interacciones a nivel bioquímico, lo cual hace que la afinidad entre ambas estructuras sea diferente también.

La ACE2 es una proteína que contiene 805 aminoácidos y presenta 2 isoformas que nacen del splicing alternativo en el proceso de transcripción del DNA celular. La isoforma 2 se estimula su síntesis mediante la familia de los interferones [41] es la que se expresa en células epiteliales del territorio nasal y bronquial y es la que utiliza el SARS-CoV2 para infectar el huésped. A lo largo de la secuencia de aminoácidos hay tres regiones de interés donde hay interacción por la Spike del virus: posiciones 30-41, 82-84 y 353-357 [42].

En la posición F486/L472 de la secuencia de aminoácidos que forma la proteína S del SARS-CoV2 se produce una cuádruple interacción entre la

F486 y los aminoácidos Q24, L79, M82 e Y83 de la ACE2. También en la posición Q493/N479 del SARS-CoV2 la Q493 interactúa con la ACE2 mediante K31, E35 y H34 [43].

En cambio, el SARS-CoV interactúa mediante la posición L472 con L79 y M82 de la ACE2 y mediante N479 interactúa con el H34 de la ACE2 [43].

De este modo el SARS-CoV2 presenta un mayor número de interacciones (7) respecto al SARS-CoV donde hay menos (3). Por otro lado, además de existir una mayor afinidad bioquímica cuantitativamente entre el SARS-CoV2 y la ACE2, los enlaces que se establecen son más fuertes, como ocurre con la Q493 del SARS-COV2 y E35 de la ACE2, donde, a diferencia del SARS-CoV1 y el MERS se establece un puente de hidrógeno que proporciona mayor estabilidad a la unión [43] (Figura 7).

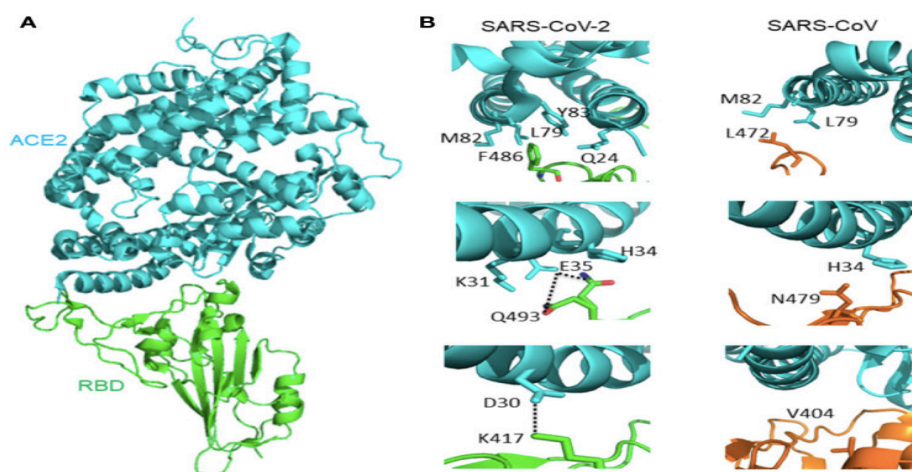


Figura 7. Tomada de Lan J et al [38]. A) Estructura general del complejo RBD-ACE2. B) Interacciones diferentes entre el RBD del SARS-CoV2 y la ACE2

De este modo el SARS-CoV2 presenta un mayor número de interacciones (7) respecto al SARS-CoV donde hay menos (3). Por otro lado, además de existir una mayor afinidad bioquímica cuantitativamente entre el SARS-CoV2 y la ACE2, los enlaces que se establecen son más fuertes, como ocurre con la Q493 del SARS-COV2 y E35 de la ACE2, donde hay un puente de hidrógeno que proporciona mayor estabilidad a la unión [43] (Figura 11).

En el análisis del alineamiento global múltiple que se recoge en Anexos 1, se ha realizado un marcaje de los aminoácidos clave señalados para ver si existen mutaciones entre los 3 coronavirus. La figura 8 recoge una región de la cadena polipeptídica donde se comparan tres posiciones comentadas anteriormente como son la 472 (L472), 486 (F486) y 493 (Q493) del SARS-CoV2 con los otros 2 virus.

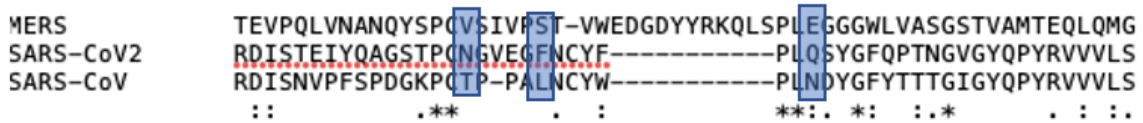


Figura 8. Región de interés del alineamiento global múltiple de la proteína S Spike entre MERS, SARS-CoV2 y SARS-CoV. Se marcan las posiciones 472, 486 y 493 del SARS-CoV2 y se compara el aminoácido con los otros virus.

Se observa como existen mutaciones puntuales en dichas posiciones entre los 3 virus, lo cual puede incidir en la estabilidad de la unión de la proteína S a la ACE2.

3.4.2 PROTEASAS DE LAS CÉLULAS HUÉSPED

El complejo de fusión de la proteína S de los CoVs presenta características promiscuas y es capaz de ser fragmentado y capacitado mediante una variedad de proteasas como la furina, tripsinas, catepsinas, TMPRSS2, TMPRSS4 o la proteasa *trypsin-like* de la vía aérea (HAT) [45]. La presencia de estas proteasas en las células huésped es capaz de definir si los CoVs entraran en la célula a través de la membrana plasmática o empleando mecanismos de endocitosis.

La furina es una proteasa que expresa la célula huésped y escinde la proteína S actuando en cuatro posiciones (P681, R682, R683 y A684) que se conocen como *furin cleavage sites*. Desde el punto de vista funcional, en el SARS-CoV2 los residuos R682, R683 y A684 contienen arginina o lisina con cargas eléctricas positivas, lo cual añade mayor afinidad entre la Spike y la furina, hecho que no sucede con el SARS-CoV, donde no se encuentran estas cargas positivas [46], lo cual explica que exista mayor virulencia en humanos. Este hecho viene refrendado por un estudio consultado donde una versión mutada del SARS-CoV2 sin expresión de los sitios de unión a la furina mostró menor replicación en células Calu3 humanas del epitelio respiratorio y, consecuentemente, una enfermedad atenuada en un modelo patogénico en hámsters [47].

TMPRSS2 es otra proteasa transmembrana fundamental para fragmentar la proteína S del SARS-CoV2 y capacitarla para permitir la entrada del virus en la célula. Esto es posible gracias a un proceso de poda del fragmento S2, lo cual permite la exposición del péptido de fusión viral y su adhesión a la bicapa lipídica de la membrana celular [36]. Esta proteasa cuando se expresa en las células huésped las torna en dianas para que el

virus pueda infectarlas [48]. Se trata de un mecanismo similar al que sucede con la fragmentación de la hemaglutinina en la patogénesis del virus Influenza [49]. En uno de los estudios consultados [50] en modelos celulares Vero que expresaban TMPRSS2 se realizó una exposición al SARS-CoV y se realizó un marcaje mediante sondas fluorescentes de la TMPRSS2 y de la proteína S, observando presencia de antígenos virales marcados en el citoplasma de las células infectadas. De esta forma se pudo comprobar como la entrada del virus en la célula dependía en gran parte de la expresión de la TMPRSS2 para poder realizar la fusión de las membranas viral-huésped.

Por último, la proteasa trypsin-like de la vía aérea o HAT se ha visto en los modelos celulares que es capaz de fracturar la proteína S del SARS-CoV en S1 y S2 por la posición R667 y, de esta forma activar la fusión de membranas viral-huésped [51]. Mientras que TMPRSS2 presenta múltiples lugares para poder fracturar la proteína S para la fusión célula-célula y virus-célula, en el caso de HAT se ha observado como la posición R667 es el lugar predilecto elegido para la fractura de la proteína S. HAT se ha visto que se coexpresa con la ACE2 en el epitelio respiratorio humano, señal de que podría estar implicada en la expansión viral en los pacientes.

3.4.3 CATEPSINAS

Las catepsinas (I, M, N y L) son unas proteínas con función enzimática presentes en el citoplasma de las células huésped y son las responsables de permitir la entrada del SARS-CoV2 utilizando los mecanismos endocíticos, es decir, mediante la formación de endosomas o pequeñas vesículas que contienen los viriones. Participan en la fractura de la proteína S en S1 y S2, maduración de los endosomas y la formación de los complejos de fusión de membranas dependiente del pH [36]. De hecho, en modelos celulares de Vero E6 donde se reproduce la infección por SARS-CoV2, la presencia de inhibidores de la catepsina L disminuía la presencia de antígenos virales en el interior de las células huésped Vero E6 [52].

3.4.4 EL RECEPTOR DE MEMBRANA CD147 (BASIGINA)

El receptor de membrana CD147, conocido como basigina o EMMPRIN, es una glicoproteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas [53] y participa, entre otros procesos, en la diseminación tumoral [54] o las rutas de infección viral o bacteriana [55,56]. En los estudios previos se había estudiado como el CD147 jugaba

un papel funcional facilitando la infección por el SARS, y como la presencia de inhibidores prevenía la infección [57]. En uno de los estudios consultados [58] se demostró como la presencia o ausencia de expresión del CD147 mediante la técnica del knockout en líneas celulares de células Vero E6 condicionaba una mayor o menor detección, respectivamente, de copias del SARS-Cov2 y de antígenos virales marcados con fluorescencia en el interior de las células. Por otro lado, en este mismo estudio [59] se empleaba el Meplazumab, un anticuerpo humanizado IgG2 que tenía como diana el CD147, impidiendo la entrada del SARS-CoV2 en la célula huésped.

3.5 DESCRIPCIÓN DEL MARCO INMUNOLÓGICO

3.5.1 GRANULOCITOS

Los granulocitos son células pertenecientes al sistema inmune innato, con funciones de defensa frente a patógenos principalmente extracelulares y con componentes enzimáticos y reactivos en gránulos contenidos en su citoplasma que sirven para llevar a cabo sus tareas de defensa inmunológica. Existen 3 tipos en función del aspecto y coloración que adquiere su citoplasma en las tinciones que se realizan para su visualización bajo microscopio: basófilos (citoplasma de aspecto punteado y azulado), eosinófilos (citoplasma de aspecto punteado y rosado) y neutrófilos (citoplasma de aspecto punteado y sin tinción específica). La mayoría de ellos se encuentran circulando en sangre periférica, y un porcentaje de ellos residen en los tejidos actuando a nivel inmunológico local y generando reclutamiento local cuando es necesario ante alguna noxa.

De entre los 3 tipos nombrados, los neutrófilos son las células inmunes más abundantes en la sangre, formando el 50-70% del total de leucocitos. Contienen sustancias enzimáticas, reactivas y tóxicas en sus gránulos, presentan de forma añadida capacidad fagocítica para englobar patógenos señalados y poder destruirlos. Además de participar como primeros actores en respuestas frente a infecciones, los neutrófilos presentan funciones importantes para mantener la homeostasis y están implicados en enfermedades inflamatorias crónicas [81].

3.5.2 MACRÓFAGO ALVEOLAR

Los macrófagos alveolares son células que, al igual que los granulocitos, pertenecen al sistema inmune innato, realizando funciones inmunológicas de identificación de potenciales patógenos y con especialización en tareas de fagocitosis y destrucción de patógenos. En el caso del tejido pulmonar los macrófagos realizan una función inmunológica clave pues se trata de un órgano expuesto al aire ambiente y, por tanto, con riesgo de infecciones y reacciones inmunológicas derivadas de partículas infecciosas y no infecciosas como por ejemplo humos o aerosoles.

Tanto los macrófagos alveolares como las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que facilitan la programación de una respuesta inmune dirigida que elaboran los linfocitos, por lo que junto a ellos forman un enlace entre el sistema inmune innato y adaptativo.

Fundamentalmente existen 2 tipos de macrófagos alveolares, denominados M1 y M2. Los macrófagos M1 representan la forma activa clásica del macrófago, derivada de la exposición frente a patrones moleculares asociados a patogenicidad o PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*, de origen viral. Su actividad viene influenciada por los linfocitos Th1. Los macrófagos M2 representan la forma activa alternativa del macrófago, influenciada por los linfocitos Th2 y la presencia de IL-4 y IL-13. Mientras que los M1 estimulan el reclutamiento de otras células inmunes en el parénquima pulmonar, la activación de los M2 provoca la liberación de citoquinas anti-inflamatorias y factores reparadores tisulares.

3.5.3 LINFOCITOS

Los linfocitos son células pertenecientes al sistema inmune adaptativo, con funciones especializadas en el reconocimiento específico de antígenos por receptores clonotípicos (inmunoglobulina de superficie o BCR para la célula B y TCR para los linfocitos T) para poder organizar una la respuesta inmunológica específica. Dicha respuesta puede ser mediante citotoxicidad celular (por medio de linfocitos T citotóxicos, habitualmente CD8) o humoral (por medio de los anticuerpos producidos por células B al transformarse en células plasmáticas).

Por tanto, los linfocitos se dividen en B y en T, en función del lugar donde se produce la maduración de los mismos y la capacitación para

reconocimiento antigénico (T en el timo y B en el bazo). Estos linfocitos expresan de forma característica marcadores en superficie CD que los permite identificar y caracterizar mediante técnicas inmunohistoquímicas. En el caso de los linfocitos T es característica la expresión del TCR/CD3, CD2, CD28/CTLA-4 y CD4 o CD8 que define las subpoblaciones TCD4+ y TCD8+. En el caso de los linfocitos B es característica la expresión del BCR, CD32, CR1-CR2, CD19, CD20 y CD5 que define las subpoblaciones B1 (CD5+) y B2 (CD5-).

Dentro de los linfocitos TCD4+ tenemos los Th1 y los Th2 en función de la clase de citoquinas que producen:

- Células Th1: su principal función es activar la inmunidad celular (macrófagos y linfocitos TCD8+) y la inmunidad humoral no IgE. Segregan IL-2, IFN- γ y TNF- α como citoquinas más destacadas
- Células Th2: activan la inmunidad humoral (células B) contra patógenos extracelulares y alérgenos (IgE). Segregan de forma característica IL-4, IL-5 e IL-6.
- Células T reguladoras (Treg): son células CD4+ que producen grandes cantidades de IL-10 y TGF-B y actúan suprimiendo las respuestas T y B,
- Células Th17: su papel fisiológico es conferir protección en barreras epiteliales mucosas. En un estudio consultado se describió la importancia del ratio Th17/Treg [95] en la evolución y pronóstico de la COVID-19. La presencia de un ratio elevado, con proliferación y aumento de la respuesta de las células Th17 al mismo tiempo que las Treg disminuyen su actividad se relacionaba consistentemente con mayor inflamación tisular, daño alveolar y mortalidad en los pacientes.

3.5.4 CELULAS NATURAL KILLER

Las células Natural Killer o linfocitos grandes granulares son células que pertenecen al sistema inmune innato, con capacidad citolítica sin necesidad de inmunización previa. Representan aproximadamente un 5% de los linfocitos circulantes y expresan CD16 y CD56 en su membrana, además de CD2 y CD8.

Sus principales funciones son la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) o indirecta y la citotoxicidad natural o directa (actividad NK) que comparten con monocitos-macrófagos y neutrófilos.

La CCDA la realizan cuando contactan con células diana opsonizadas, es decir, marcadas con moléculas de IgG unidas a algún antígeno de superficie. Los NK utilizan su molécula de membrana CD16 para unirse al receptor de la IgG y, de esta forma, se activan e inician la secreción de sus gránulos con actividad peroxidasa para destruir estas células.

La citotoxicidad natural o directa la llevan a cabo mediante la identificación en la superficie celular de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC-1). El sistema de identificación funciona por el modelo de doble receptor KIR (inhibidores)/KAR (activadores). Los ligandos naturales de los KIR son las MHC-1 y, si esto sucede, la célula NK "tolera" a la célula y no se activa. En el caso de no encontrar MHC-1 en la superficie celular, como ocurre en las que están infectadas por virus, se activan y destruyen la célula. Los ligandos de los KAR se desconocen actualmente.

4. METODOLOGÍA

Para realizar la comparación entre los proteomas de los betacoronavirus más relevantes en cuanto a la afectación del huésped humano hemos recurrido a alineamientos globales mediante la herramienta ClustalW [31], la cual ha permitido comparar las secuencias de aminoácidos entre algunas de las proteínas más relevantes que se expresan por estos virus. También se ha utilizado el programa BLASTP [32] para realizar el alinamiento a partir de unas secuencias de aminoácidos de interés conocidas para estudiar la homología y la similaridad en la estructura primaria entre diferentes proteínas virales de los tres betacoronavirus.

La herramienta Uniprot [40] es una base de datos gratuita que contiene información detallada sobre la secuencia, estructura y funciones de un número destacado de proteínas. En esta base de datos se integran datos de proteínas procedentes de otras bases de datos como Swiss-Prot. El uso de esta herramienta ha sido útil para identificar las secuencias de las proteínas estudiadas del SARS-CoV2, SARS-CoV y MERS. De esta forma, eligiendo las secuencias hemos podido realizar los alineamientos con ClustalW. También hemos podido identificar funciones moonlighting de las proteínas del SARS-CoV2 y del huésped.

Mediante el uso de la herramienta bioinformática Bepipred [44] se ha estudiado la presencia de epítopos a lo largo de la secuencia polipeptídica. Este programa permite definir valores de antigenicidad

mediante algoritmos basados en predicciones sobre estructuras cristalográficas de aminoácidos epítomos y no epítomos. Los fundamentos y la caracterización de dichos algoritmos quedan fuera del estudio del presente trabajo.

Dichos epítomos se consideran potenciales inductores de respuesta celular B, con capacidad para generar anticuerpos frente a ellos . Bepipred asigna puntuaciones a los aminoácidos y considera que un aminoácido puede ser un potencial epítomo B si el valor asignado es igual o superior a 0.5, con una sensibilidad y especificidad del 60% respectivamente de acuerdo con la herramienta.

Para analizar la expresión hemos recurrido a “The human Protein Atlas” [78], una de las bases de datos más completas y de uso extendido sobre expresión proteica en diferentes grupos celulares. En la mayor parte de los casos la expresión proteica se puede estudiar mediante técnicas inmunohistoquímicas por el grado de tinción que alcanzan las muestras tisulares tras someterlas a procesamiento con anticuerpos que van dirigidos frente a las proteínas que se pretenden detectar. Tras permitir la unión entre proteína diana y anticuerpo se realiza un lavado de las impurezas de la muestra y una tinción para después poderla visualizar en el microscopio. En “The human Protein Atlas” la puntuación de expresión proteica se basa en los datos recogidos sobre las tinciones inmunohistoquímicas (intensidad de tinción) y la fracción de células teñidas. Esta combinación de factores se convierte de forma automatizada en niveles de expresión proteica de acuerdo con:

- NEGATIVO: no existe detección del anticuerpo ni tinción alguna.
- ESCASO: débil detección del anticuerpo con <25% de células teñidas.
- LEVE: débil detección del anticuerpo con 25-75% de células teñidas.
- MODERADO-DEBIL: detección moderada del anticuerpo con > 25% de células pero < 75% de células teñidas.
- MODERADO-FUERTE: detección moderada del anticuerpo con > 75% de células teñidas.
- FUERTE: detección fuerte del anticuerpo con > 75% de células teñidas.

5. RESULTADOS

5.1 COMPARACIÓN DE LOS PROTEOMAS ENTRE SARS-COV2, SARS-COV Y MERS

Primeramente se ha utilizado como modelo la proteína Spike (S) expresada en los tres tipos de virus. Se trata de una proteína estructuralmente grande, de 1,273 aminoácidos, en la que se ha centrado en la estructura primaria de la proteína, es decir, en la secuencia de aminoácidos, y se ha comparado mediante ClustalW la homología que existe en esta proteína entre los virus (figura 9).

```
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
```

1: MERS	100.00	31.93	32.27
2: SARS-COV2	31.93	100.00	77.46
3: SARS-COV	32.27	77.46	100.00

Figura 9. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de la proteína Spike entre 1) MERS, 2) SARS-CoV1 y 3) SARS-CoV2

De la figura 9 se observa como el porcentaje mayor de homología de la secuencia de aminoácidos reside entre el SARS-CoV1 y el SARS-CoV2 (77.46% de homología), mientras que existe una homología menor entre el MERS y los SARS-CoV. En el apartado de Anexos 1 se incluye el alineamiento global múltiple de la proteína Spike.

Si se realiza el alineamiento de los fragmentos S2 de la proteína S Spike entre los virus el resultado que se obtiene es ligeramente diferente, como muestra la figura 10. En este segundo caso aumenta la homología de la secuencia, seguramente porque exista una mayor conservación en los nucleótidos de la región del gen que codifica este fragmento. En el apartado de Anexos 2 se incluye el alineamiento global múltiple de los fragmentos S2.

```
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
```

1: MERS	100.00	42.96	42.44
2: SARS-COV2	42.96	100.00	89.97
3: SARS-COV	42.44	89.97	100.00

Figura 10. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW del fragmento S2 de la Spike Protein entre 1) MERS, 2) SARS-CoV1 y 3) SARS-CoV2

Por otro lado, también dentro de la proteína S hemos seleccionado la secuencia de aminoácidos que constituye el dominio de unión al receptor (RBD) gracias al navegador genómico NCBI RefSeq y a BLAST, que ha permitido seleccionar la secuencia de interés del RBD del SARS.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: MERS	100.00	21.67	20.83
2: SARS-CoV	21.67	100.00	73.42
3: SARS-CoV2	20.83	73.42	100.00

Figura 11. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW del RBD entre 1) MERS, 2) SARS-CoV1 y 3) SARS-CoV2.

De la figura 11 podemos ver como existe una homología elevada (73.42%) entre la secuencia de aminoácidos que conforma el RBD de ambos SARS-CoV, mientras que, a diferencia de la figura 6, la homología es sensiblemente menor. Por otro lado, llamaba la atención que el MERS tenía un RBD formado por 120 aminoácidos mientras que en el caso de los SARS-CoV contenía casi doble de aminoácidos (221 y 240 aminoácidos respectivamente para el SARS-CoV1 y el SARS-CoV2). Este hecho puede deberse a que probablemente en estos SARS-CoV hayan permanecido inactivos los sistemas de silenciamiento génico y se haya favorecido la transcripción y traducción de secuencias previamente silenciadas en el MERS. En el apartado de Anexos 3 se incluye el alineamiento global múltiple de la región RBD de la proteína Spike.

También es probable que esta falta de homología entre el MERS y los SARS-CoV en los casos de la proteína S Spike y el RBD se deba la presencia de un virus predecesor ancestral a partir del cual se originaron ambos coronavirus mediante especiación.

En segundo lugar hemos realizado el alineamiento global entre las ARN-polimerasas (RdRp) de los tres virus. La figura 12 revela que existe una homología total (100%) en la secuencia de aminoácidos que componen la RdRp del MERS y del SARS-CoV1, casi total entre los SARS-CoV (98.24%) y algo menor aunque considerable (65.53%) entre el MERS y el SARS-CoV2. En el apartado de Anexos 4 se incluye el alineamiento global múltiple de la RdRp.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: MERS	100.00	100.00	65.53
2: SARS-CoV1	100.00	100.00	98.24
3: SARS-CoV2	65.53	98.24	100.00

Figura 12. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de la RdRp entre 1) MERS, 2) SARS-CoV1 y 3) SARS-CoV2.

En último lugar se ha realizado el alineamiento global entre las proteasas virales de los tres virus, las cuales tienen una longitud aproximada de 300 aa. En la figura 13 observamos una homología elevada entre los SARS-CoV (95.96%) y escasa (50%) entre el MERS y los SARS-CoV. En el apartado de Anexos 5 se incluye el alineamiento global múltiple de la proteasa viral.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: MERS	100.00	50.83	51.82
2: SARS-COV2	50.83	100.00	96.08
3: SARS-COV	51.82	96.08	100.00

Figura 13. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de la proteasa viral entre 1) MERS, 2) SARS-CoV1 y 3) SARS-CoV2.

5.2 INMUNOGENICIDAD DE LA PROTEÍNA SPIKE

Otra de las formas de interacción que presenta el SARS-CoV2 es con el sistema inmunológico innato y adaptativo. La experiencia clínica y la recogida de datos en los pacientes graves ha podido corroborar cómo una de las claves de la enfermedad es la respuesta inflamatoria generada. En este sentido una de las principales causas detrás puede encontrarse en la capacidad de ciertos elementos del virus para generar respuesta inmunológica. Se ha analizado el ejemplo de la proteína S Spike, el principal elemento del SARS-CoV2 capaz de fijarse a las células diana y poderse internalizar el virus.

La presencia de diferencias epidemiológicas y clínicas entre las infecciones por los tres coronavirus (SARS-CoV, MERS y SARS-CoV2) ha centrado las sospechas sobre la proteína S Spike y su capacidad inmunógena.

En las figuras 14-16 se ha realizado la comparación entre tres segmentos respectivamente de la proteína S Spike de los tres coronavirus: receptor-binding domain (RBD), fragmento S2 y fragmento S1.



Figura 15. Análisis mediante Bepipred de las regiones dentro de la secuencia polipeptídica del fragmento S2 de los 3 coronavirus. La columna superior corresponde al SARS-CoV2, la del medio al SARS-CoV y la inferior al MERS. Se han marcado con un cuadro azul las regiones más interesantes en el análisis.

Se realizaron los alineamientos de las diferentes regiones antigénicas (3) indicadas en la secuencia del fragmento S2 de los 3 coronavirus. La figura 16 recoge los resultados de la matriz de identidad y llama la atención la homología de dichas regiones entre el SARS-CoV2 y el MERS (77%, 90% y 100% respectivamente). Este hecho recalca la capacidad inmunógena del SARS-CoV2 que parece haber tomado del MERS, con mayor virulencia según los datos de la epidemia de 2006.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1			
1: SARS-COV2	100.00	77.42	32.00
2: MERS	77.42	100.00	32.00
3: SARS-COV1	32.00	32.00	100.00

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1			
1: SARS-COV2	100.00	90.91	33.33
2: MERS	90.91	100.00	25.00
3: SARS-COV1	33.33	25.00	100.00

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1			
1: SARS-COV2	100.00	100.00	21.05
2: MERS	100.00	100.00	21.05
3: SARS-COV1	21.05	21.05	100.00

Figura 16. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de los segmentos antigénicos marcados en la secuencia del fragmento S2 en los 3 coronavirus.

En último lugar, de la figura 16 se puede decir que, respecto al fragmento S1, MERS presenta 18 regiones de potenciales epítomos, mientras que SARS-CoV y SARS-CoV2 presentan 17 y 19 regiones respectivamente. En el caso de este fragmento de la proteína S parece que las regiones 7-20 y 41-63 al principio de la secuencia son potenciales epítomos en los 3 virus. Posteriormente a nivel central, en las regiones 330-348 y 429-470, también hay coincidencia en las predicciones de epítomos en los 3 virus. Muy probablemente estas regiones sean las que quedan expuestas cuando se produce la fragmentación de la proteína S en S1 y S2. Al comparar las secuencias polipeptídicas en estas regiones entre los tres coronavirus se aprecia una menor conservación en comparación con los anteriores elementos de la proteína S que se mencionan en las anteriores figuras.

Name	Sequence Markup
SARS-COV2	Epitopes :EEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEE.....EEEEEEEE Predictions: SQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFYSNVTWPHAIHVSQTNGT 1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----
MERS	Epitopes : ...EEEEEEEEEEEEEE.EEEEEEEEE.....EEEEEEEE Predictions: YVDVGPDSVKSACIEVDIQQTFFDKTWPRPIDVSKADGIIYPOGRTYSNITITYQGLFPYQGDH 1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----
SARS-COV	Epitopes :EEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEE Predictions: SDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHTFG 1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----

EEE.....EEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEE..... KRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNAATNVVIKVFCEFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYS -----70-----80-----90-----100-----110-----120-----130-----140-----
EEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEE SDMYVYSAGHATGTTPOKLFVANYSQDVKQFANGFVVRIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAPMLGSSVGNFSDGKMGRRFFN -----70-----80-----90-----100-----110-----120-----130-----140-----
EEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEE NPVIPFKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQHTMIFDNAFNCTFE -----70-----80-----90-----100-----110-----120-----130-----140-----

.....EEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEE.....EEE.....
SANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLRVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHR
150-----160-----170-----180-----190-----200-----210-----220-----230---

.....EE.....EEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....
HTLVLLPDGCGTLLRAFYCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKYFNLRNCTFMYTYNITEDEIL
150-----160-----170-----180-----190-----200-----210-----220-----230---

.....EEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEE
YISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKNDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPQGFNTLKPFPKPLGINITNFRAILTAFSPAQDIWGT
150-----160-----170-----180-----190-----200-----210-----220-----230---

..EEEEEEEEEE.....E.....E.E.....EEEEEEEEEEEEEEEE.E.....E
SYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPN
-----240-----250-----260-----270-----280-----290-----300-----310-----

.....EEEE.....EEEE.....EEEE.....
EWFGITQTAQGVHLFSSRYVDLYGGNMFQFATLPVYDTIKYYSIIPHSIRSISQDRKAWAAFVYVYKQPLTFLLDFSDVGYIRRA
-----240-----250-----260-----270-----280-----290-----300-----310-----

.....E.....E.E.....EEEEEEEEEEEEEEEE.....E.....EEEE
SAAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPDGVVRFNITNLCPFGEVFNAT
-----240-----250-----260-----270-----280-----290-----300-----310-----

.....EEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEE...E.EEEEE.....EEEEEEEEEEEEEE
ITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTG
320-----330-----340-----350-----360-----370-----380-----390-----400---

...EEEEEE.....EEEEEEEEEE.....E.....EEEEEEEEEEEEEEEE.....E.....EEE
IDCGFNDSLQHLCSYESFDVESGVYSVSFEAKPSGVSVEQAEGVECDFSPLLSGTPPVYVNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVN
320-----330-----340-----350-----360-----370-----380-----390-----400---

EEEEEEEEEEEEEEEEEE.E..EEEEEEEE.....E.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....
KFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNLCFSNVYADSFVVKGDDVQRQIAPGQTGVYADYNYKLPDDFM
320-----330-----340-----350-----360-----370-----380-----390-----400---

EEEEEEEEEE.....EE.....
GKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDKSVGGNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPT
-----410-----420-----430-----440-----450-----460-----470-----480-----

EEEEEEEEEEEEEE.....EE
NDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPLSMKSDLSVSSAGPISQFNYKQSFNSNPTCLILATVPHNLTITKPLKYSYINKCSR
-----410-----420-----430-----440-----450-----460-----470-----480-----

.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE.....E.....
MGCVLAWNTRNIDATSTGNINYKYRYLHRGKLRPFERDISNVFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQYPRVVVLSF
-----410-----420-----430-----440-----450-----460-----470-----480-----

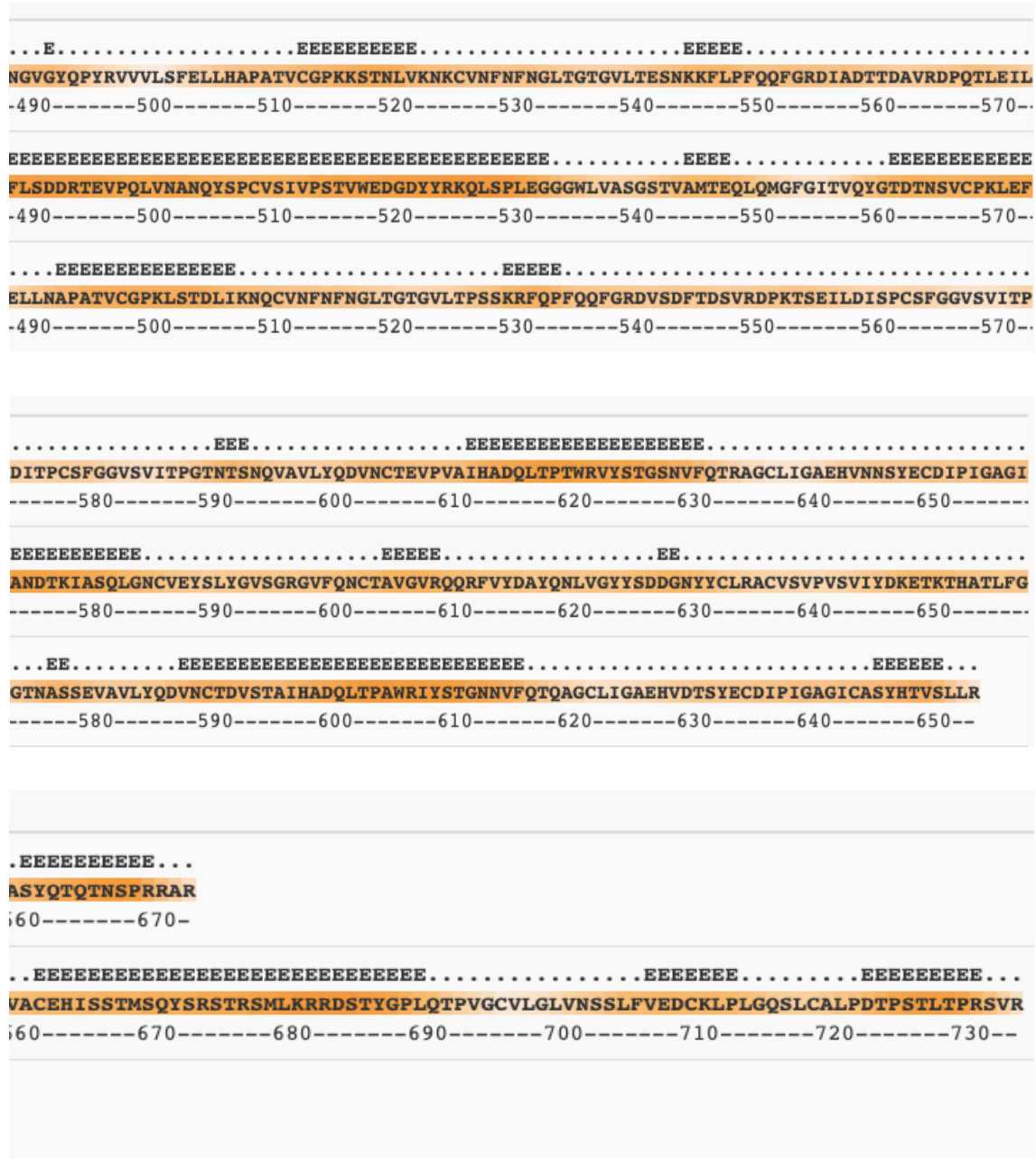


Figura 17. Análisis mediante Bepipred de las regiones dentro de la secuencia polipeptídica del fragmento S1 de los 3 coronavirus. La columna superior corresponde al SARS-CoV2, la del medio al SARS-CoV y la inferior al MERS. Se han marcado con un cuadro azul las regiones más interesantes en el análisis.

Nuevamente se realizaron los alineamientos de las diferentes regiones antigénicas (4) en la secuencia del fragmento S1 de los 3 coronavirus. La figura 18 recoge los resultados de la matriz de identidad y se observa en general falta de homología en estos segmentos antigénicos entre los 3 coronavirus (27%, 31%, 14% y 16.67% respectivamente). De este modo, parece que el fragmento S1 de cada coronavirus contiene segmentos con una capacidad inmunógena diferente, sin existir similitudes claras entre ellos.

```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

  1: SARS-COV1  100.00  10.00  27.27
  2: SARS-COV2   10.00 100.00  25.00
  3: MERS        27.27  25.00 100.00
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

  1: SARS-COV1  100.00  16.67  31.25
  2: SARS-COV2   16.67 100.00  50.00
  3: MERS        31.25  50.00 100.00
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

  1: SARS-COV1  100.00  14.29  19.05
  2: SARS-COV2   14.29 100.00  90.00
  3: MERS        19.05  90.00 100.00
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

  1: SARS-COV1  100.00  29.63  16.67
  2: SARS-COV2   29.63 100.00  39.13
  3: MERS        16.67  39.13 100.00

```

Figura 18. Matriz de identidad del alineamiento global mediante ClustalW de los segmentos antigénicos marcados en la secuencia del fragmento S1 en los 3 coronavirus.

5.3 MULTIFUNCIONALIDAD DEL PROTEOMA: PROTEÍNAS MOONLIGHTING Y SARS-COV2

Las proteínas moonlighting, también conocidas como multifuncionales, son proteínas capaces de realizar más de una función biológica en diferentes compartimentos celulares del organismo [59-61]. En esta clase de proteínas es posible que una cadena polipeptídica realice dos o más funciones bioquímicas diferentes [62,63]. De esta forma, se dice que una proteína moonlighting posee una función canónica y una o varias funciones moonlighting. La función canónica es la primera descrita, mientras que las funciones moonlighting son las descritas posteriormente en la literatura biomédica. Generalmente, las funciones canónicas están implicadas en procesos celulares fundamentales como metabolismo, síntesis proteica o síntesis de ácidos nucleicos; mientras que las funciones moonlighting hacen referencia a funciones más complejas y de adquisición posterior a nivel

evolutivo, como unión a proteínas del sistema inmune o a células fagocíticas.

En primer lugar recogemos en la tabla 5 las proteínas expresadas por el SARS-CoV2 e indicamos las funciones que se han descrito. Aquellas con más de una función entran en la definición de proteína moonlighting y han sido marcadas en la tabla.

Tabla 5. Proteínas expresadas por el SARS-CoV2 obtenidas gracias a la plataforma Uniprot junto con la anotación GO (Gene Ontology). En naranja se marcan las proteínas multifuncionales o moonlighting. De las funciones descritas en dichas proteínas se desconoce cuál es la función primera o canónica y cuáles las secundarias o moonlighting. TBK1: serine/threonine-protein kinase ; MPP5: membrane palmitoylated protein 5

PROTEINAS SARS-CoV2		FUNCIÓN O FUNCIONES
Poliproteína 1ab (pp1ab)	Nsp1	Inhibidor de la traducción del huésped [GO: 0039604]
	Nsp2	Interacción con PHB y PHB2 de la mitocondria del huésped [GO: 0039519]
	Nsp3	Fragmenta el extremo N-terminal de la poliproteína pp1ab [GO: 0008234]
		Junto con Nsp4 participa en el ensamblaje de las vesículas citoplásmicas que contienen partículas virales [GO: 0019082]
		Interfiere en la síntesis y acción del interferón [GO: 0039501]
		Bloquea la señalización del NF-Kappa (proinflamatorio) [GO: 0039644]
	Nsp4	Ensamblaje de las vesículas citoplásmicas que contienen partículas virales [GO: 0019082]
	Proteinasa 3C	Fragmenta el extremo C-terminal de la poliproteína pp1ab en 11 sitios [GO: 0008234]
Nsp6	Induce la formación de autofagosomas a partir del RE del huésped [GO: 0039519]	

	Nsp7	Síntesis del RNA viral [GO: 0039690]
	Nsp8	Síntesis del RNA viral [GO: 0039690]
	Nsp9	Unión al RNA de cadena simple para estabilización y traducción [GO: 0003727]
	Nsp10	Metilación de la cabeza del mRNA viral [GO: 0080009]
	RNA polimerasa	Replicación y transcripción del genoma viral [GO: 0019079]
	Helicasa	Dominio de unión frente al RNA-DNA para desenrollar la molécula [GO: 0003678]
		Unión al TBK1 del huésped [GO: 0039723]
		Inhibición de la fosforilación del TBK1 [GO: 0039723]
	Exoribonucleasa	Actividad exoribonucleasa en ssRNA y dsRNA [GO: 0004532]
		Actividad N7-guanina metiltransferasa [GO: 0008168]
	Endoribonucleasa	Actividad endoribonucleasa [GO: 0004519]
	2'-O-metiltransferasa	Metilación de la cabeza del mRNA viral [GO: 0080009]
Glucoproteína S	Proteína Spike S1	Unión al receptor ACE2 y entrada del virus en el huésped [GO: 0046789]
	Proteína Spike S2	Media la fusión de membranas entre el virus y el huésped celular [GO: 0046789]
	Proteína Spike S2'	Péptido de fusión viral desenmascarado tras la fractura de la S2 [GO: 0046789]
Proteína E	Proteína E	Morfogénesis y ensamblaje viral [GO: 0019082]
		Inducción de apoptosis celular [GO: 0039707]
		Interacción con la MPP5 del huésped y disrupción de las barreras epiteliales [GO: 0044662]

En la infección por SARS-CoV1 y MERS se pudo demostrar en varios estudios como utilizaban el receptor de membrana o cluster de diferenciación 26 (CD26), también conocido como *dipeptidyl peptidase-4* (DPP-4) [64,65].

El CD26/DPP-4 se expresa mayormente en el linfocito Th1 más que en el Th2 [66] y su expresión aumenta con el envejecimiento [67]. Desde el punto de vista inmunológico, ante la exposición a un agente infeccioso el linfocito Th0 puede polarizar su respuesta en Th1, responsable en sujetos inmunocompetentes de actuar sobre patógenos intracelulares o fagocitables como virus, bacterias u hongos y mediada por macrófagos y linfocitos citotóxicos (Tc); o en respuesta Th2, dirigida clásicamente contra patógenos extracelulares no fagocitables como helmintos, siendo los granulocitos, mastocitos y las células B los efectores de la respuesta.

En la infección por SARS-CoV2 se ha observado que el sistema inmune organiza una respuesta Th2 en los pacientes más graves que precisan cuidados intensivos en vez de una respuesta Th1 que, en condiciones normales podría permitir el control de la infección mediante macrófagos y Tc.

En el caso de la infección por SARS-CoV2 se mostró en dos estudios de análisis bioinformático como la subunidad S1 de la glicoproteína Spike además de unirse a la ACE2, como sucede con el SARS-CoV1, también puede interactuar con CD26/DPP-4 [68,69]. Este último hecho puede ser el responsable, al igual que sucede con la infección por MERS, de la virulencia de la enfermedad. Es posible imaginar que la sobreexpresión del CD26/DPP-4 en las células Th1 implica en ellas un mayor tropismo y daño por el virus, forzando al sistema inmune a montar la respuesta Th2, la única disponible, en un intento de combatir el patógeno con los efectores Th2. De esta forma el paciente presenta los efectos negativos de la respuesta Th2 que pueden empeorar el escenario clínico [70].

Por otro lado, se ha estudiado el papel de una familia de enzimas conocidas como peptidylarginine deiminases (PADs), responsables de modificaciones post-traduccionales e implicadas en la regulación de la liberación de vesículas extracelulares en situaciones inflamatorias. Hay descritas numerosas isoenzimas, con funciones putativas en la respuesta

inmunológica. En el estudio consultado [71] se observó como había cambios en la expresión de las isoenzimas, incluyendo la modulación de las formas 2, 3 y 4 en el tejido pulmonar en respuesta a la infección por SARS-CoV2. Es posible la diferente expresión de las isoformas 1 a 6 en las biopsias de pacientes infectados sugiera una relación con la afectación de diferentes órganos descrita en la COVID-19, por ejemplo la presencia de PAD1 en la piel podría explicar las manifestaciones cutáneas de la enfermedad o PAD4 el compromiso del sistema nervioso central y periférico.

En la tabla 6 se resumen algunas proteínas del huésped que pueden desempeñar varias funciones y que pueden formar parte del grupo de proteínas moonlighting.

Tabla 6. Proteínas moonlighting expresadas por las células huésped obtenidas gracias a la plataforma Uniprot junto con la anotación GO (Gene Ontology). FAP: Fibroblast activation protein. TCR: T Cell Receptor.

PROTEINAS DEL HUÉSPED	FUNCIONES DESCRITAS
CD26/DPP-4	Receptor de superficie coestimulador [GO:0031295] del TCR [GO:0031295] y de la activación de las células T
	En asociación con FAP contribuye a la proteólisis pericelular de la matriz extracelular [GO: 0006508]
	Promueve la adhesión, migración y formación de microtúbulos de los linfocitos circulantes [GO: 0007155]
	Migración de las células endoteliales [GO:0043542]
	Actividad aminopeptidasa [GO: 0004177]
	Actividad peptidasa serine-type [GO:0008236]
	Actividad endopeptidasa serine-type [GO:0004252]
	Actividad dipeptidil-peptidasa [GO:0008239]
PAD	
PAD1	Actividad deaminasa de los residuos de arginina de las proteínas [GO:0004668]
PAD2	Actividad deaminasa de los residuos de arginina de las proteínas [GO:0004668]
	Unión al receptor de estrógenos [GO:0030331]
PAD3	Actividad deaminasa de los residuos de arginina de las proteínas [GO: 0004668]
	Unión a proteínas similares [GO: 0042802]
PAD4	Unión a residuos de arginina [GO: 0034618]
	Unión a proteínas similares [GO: 0042802]

	Actividad deaminasa de los residuos de arginina de las proteínas [GO: 0004668]
TMPRSS2	Actividad de receptor scavenger [GO: 0005044]
	Actividad endopeptidasa serine-type [GO: 0004252]
	Actividad peptidasa serine-type [GO: 0008236]
TMPRSS4	Actividad de receptor scavenger [GO: 0005044]
	Actividad endopeptidasa serine-type [GO: 0004252]
	Actividad peptidasa serine-type [GO: 0008236]
FURIN	Actividad endopeptidasa [GO: 0004175]
	Unión a péptidos [GO: 0042277]
	Unión a proteasa [GO: 0002020]
	Actividad peptidasa [GO: 0008233]
	Actividad endopeptidasa serine-type [GO: 0004252]
CD147 (BASIGIN)	Unión a cadherinas [GO: 0045296]
	Mediados de la adhesión celular [GO: 0098632]
	Unión a manosas [GO: 0005537]
	Receptor con señalización [GO: 0038023]
	Receptor viral [GO: 0001618]

5.4 DESCRIPCIÓN DEL PROTEOMA EXTRACELULAR

El medio extracelular también se ha visto envuelto en la infección por SARS-CoV2, experimentando una transformación a nivel cuantitativo y cualitativo de algunos de los componentes que lo forman. Prueba de ello ha sido el empleo clínico de plasma de pacientes convalecientes [72] para el tratamiento de los casos más graves de enfermedad mediante el bloqueo de la unión entre la ACE2 y la proteína Spike con anticuerpos neutralizantes.

En un estudio consultado [73] se identificó en suero un aumento de la síntesis de componentes de la cascada del complemento, así como numerosas enzimas con actividad antimicrobiana, especialmente en el grupo de pacientes que presentaba niveles elevados de interleucina-6 (IL-6). Esta citoquina es la responsable de mediar respuestas inflamatorias como la síntesis de números proteasas como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), matrilisina (MMP7) y estromalisina-1 (MMP3), capaces de fragmentar subclases de inmunoglobulina IgG y entorpecer la respuesta mediada por anticuerpos. De otra forma, se ha observado como los coronavirus son capaces de expresar enzimas papain-like o papaínas [74], responsables de la fractura de los anticuerpos en los fragmentos Fab y Fab2'.

Por otro lado, la presencia en suero de marcadores de lisis celular como la lactato deshidrogenasa (LDH) se correlacionan significativamente con marcadores de daño epitelial en relación con el tropismo que presenta el SARS-CoV2 por las células epiteliales con niveles elevados de expresión del receptor ACE2 [75]. Algunos de estos hallazgos refuerzan la capacidad predictiva de gravedad de escalas como el sistema COVID-GRAM, basado en el ratio neutrófilo-linfocito, LDH o los niveles de bilirrubina directa, entre otros factores [76].

Por último, en la COVID-19 se ha observado un comportamiento de un estado de hipercoagulabilidad, con aumento de factores procoagulantes y activación de cascadas fibrinolíticas responsables del aumento del D-dímero o del fibrinógeno en los pacientes más graves [77]. Los resultados de uno de los estudios consultados [73] muestran la correlación entre niveles aumentados de IL-6 con niveles altos de los factores de coagulación 5,7 y 10. En dicho estudio también subrayan los autores la sobreexpresión de componentes antifibrinolíticos del grupo de las SERPINs (serine protease inhibitors), causando un agotamiento de los factores fibrinolíticos y, secundariamente, la posibilidad de desarrollar fenómenos coagulativos.

5.5 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS PRINCIPALES CÉLULAS INFECTADAS

En este apartado estudiamos la expresión proteica de las principales células afectadas por la infección por SARS-CoV2 de acuerdo con la bibliografía consultada en el trabajo. Analizaremos el perfil de expresión de dichas células diana y, además del receptor ACE2, incluiremos en la descripción y comparación las principales proteasas expresadas, las catepsinas, el CD147, el CD26/DPP-4 y las PADs.

5.5.1 NEUMOCITO TIPO 1

Las células epiteliales alveolares o neumocitos tipo 1 son células de aspecto aplanado que tapizan las paredes alveolares y permiten el intercambio gaseoso entre el aire dentro del alveolo y el capilar que discurre cercano al mismo. Se han descrito 652 genes sobreexpresados en este grupo celular en comparación con otros tipos celulares. Algunas de las proteínas más relevantes que expresan son la aquaporina 4 y la claudina

18, responsables ambas de regular la homeostasis local y el paso de sustancias activas a través del epitelio alveolar.

La expresión proteica del receptor ACE2 se ha visto que es muy escasa en este grupo celular. Para ello se utilizaron la batería de anticuerpos HPA000288, CAB026174, CAB026213, CAB080024, CAB080025, CAB080027 y CAB080028, todos ellos anticuerpos obtenidos a partir de suero de ratones y conejos por varias compañías proveedoras.

Sin embargo, llama la atención la presencia de expresión de ACE2 detectada por estos anticuerpos en muestras de nasofaringe [79], particularmente en las células epiteliales ciliadas que tapizan este segmento de la vía aérea. Este hecho explica que este grupo celular pueda actuar como reservorio del SARS-CoV2 y, al mismo tiempo, justifica la obtención de muestras mediante frotis de esta región de la vía aérea para realizar la PCR y obtener el diagnóstico de la infección por SARS-CoV2.

Con respecto a las proteasas que comentábamos en anteriores apartados, los neumocitos tipo 1 expresan característicamente TMPRSS2 pero no TMPRSS4; expresan furina principalmente en la nasofaringe y, en menor medida en el epitelio bronquial; HAT presenta una expresión elevada significativa en nasofaringe y en las células epiteliales del tejido bronquial; las catepsinas, principalmente la isoformas A-B-C-D-E-H-L-O-S-V-W-Z, presentan expresión significativa en mayor o menor medida, principalmente en neumocitos tipo 1 pero también en células epiteliales ciliadas del epitelio bronquial; por último ADAM17 presenta expresión en nasofaringe, epitelio bronquial y neumocitos tipo 1 (tabla 7).

Tabla 7. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los neumocitos tipo 1 y células epiteliales bronquiales. TMPRSS2: transmembrane protease serine 2. TMPRSS4: transmembrane protease serine-4. HAT: Human Airway Trypsin-like protease. ADAM17: ADAM metallopeptidase domain 17.

GRADO DE EXPRESIÓN	TMPRSS2	TMPRSS4	FURINA	HAT	CATEPSINAS	ADAM17
ALTO	X	-	-	X	X	-
MEDIO	-	-	-	-	X	X
BAJO	-	X	X	-	-	-

De entre las PADs apenas existe expresión en este grupo celular. La mayoría de isoformas aparecen expresadas en el tracto gastrointestinal y en el tejido urotelial.

Por otro lado, la expresión de CD26/DPP-4 es algo mayor en este grupo celular, con datos que avalan una expresión moderada en las células alveolares y algo menor en nasofaringe.

En el caso del CD147 (basigina) existe una expresión proteica moderada reconocida en las células alveolares tipo 1, significativamente menor en comparación con otras células como los macrófagos. Se ha observado como principalmente el CD147 muestra mayor expresión en células epiteliales del tracto gastrointestinal, tejido urotelial y tejido muscular.

5.5.2 NEUMOCITO TIPO 2

Las células epiteliales alveolares o neumocitos tipo 2 son células de aspecto cúbico que se intercalan entre los neumocitos tipo 1 y son responsables de la producción del surfactante, sustancia tensioactiva fundamental para mantener expandido el alvéolo, evitando fenómenos de atelectasia o colapso alveolar y permitiendo el correcto intercambio gaseoso. De este modo, una de las proteínas que aparece sobreexpresada es la proteína C del surfactante y una peptidasa aspártica de la napsina A (NAPSA), responsable del procesado final de la proteína B del surfactante.

Con respecto a la infección por SARS-CoV2 en uno de los estudios consultados se ha observado que, de entre los grupos celulares que conforman el alveolo, el de los neumocitos tipo 2 es el que fundamentalmente expresa transcritos (mRNA) de la ACE2 [79,80]. No obstante, dentro del grupo de neumocitos tipo 2 únicamente un 1-2% de estas células sobreexpresaban ACE2 en la membrana apical de la célula (figura 19). Con tinción inmunodirigida hacia la proteína C del surfactante se pudo corroborar la identidad de dicho grupo celular de ACE2+ y, además, se observó presencia de estas células en secciones histológicas de paredes alveolares colapsadas así como una morfología hiperplásica y más redondeada que las células ACE2-.

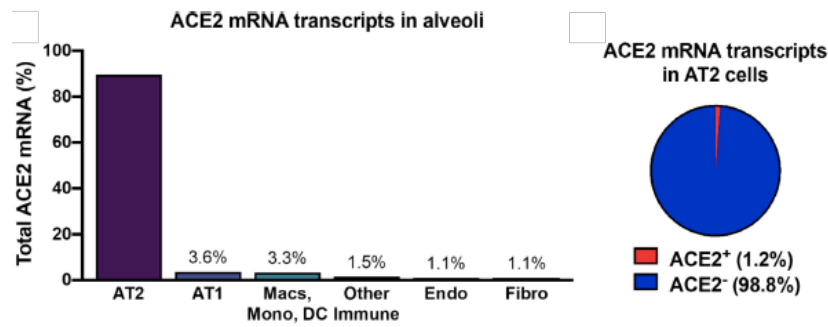


Figura 19. Tomado de [79]. Expresión de mRNA de ACE2 en el tejido pulmonar y de sobreexpresión en 1-2% de las células alveolares tipo 2 (AT2 cells)

Por otro lado en este mismo estudio [79], se observó una mayor expresión de TMPRSS2, proteasa que facilita la entrada del SARS-CoV2 en las células ACE2+, en la mitad aproximadamente de los neumocitos tipo 2 marcados como ACE2+. Dicha expresión se observó que tenía lugar, al igual que la ACE2, en la membrana apical del neumocito tipo 2, hecho que sugiere mayor susceptibilidad en estas células para la penetración del SARS-CoV2 y la generación de enfermedad (figura 20).

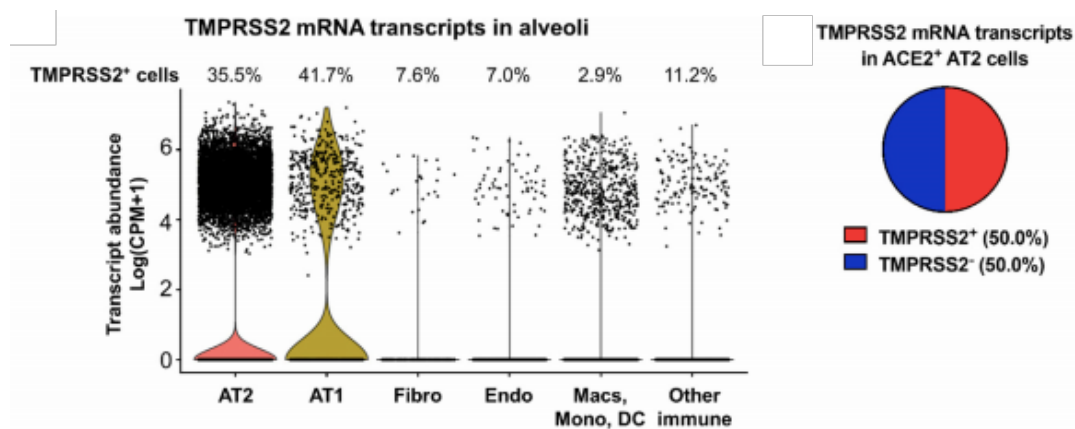


Figura 20. Tomado de [79]. Expresión de mRNA de TMPRSS2 en el tejido pulmonar y de sobreexpresión en 50% de las células alveolares tipo 2 (AT2 cells).

Con respecto al resto de las proteasas los neumocitos tipo 2 presentan una leve expresión de TMPRSS4, una isoforma diferente a la que comentábamos anteriormente de la TMPRSS2, además de mucha mayor expresión de la furina en comparación con los neumocitos tipo 1. En el caso de las catepsinas este grupo celular expresan mayormente las isoformas A-B-F-H-K-W, siendo la isoforma H la que más expresan. Estas células también aumentada la expresión de ADAM17 (tabla 8).

Tabla 8. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los neumocitos tipo 2. La presencia de 2 aspas en una misma columna indica que la expresión en algunos grupos dependiendo de la localización en la vía aérea es diferente. TMPRSS2: transmembrane protease serine 2. TMPRSS4: transmembrane protease serine-4. HAT: Human Airway Trypsin-like protease. ADAM17: ADAM metallopeptidase domain 17.

GRADO DE EXPRESIÓN	TMPRSS2	TMPRSS4	FURINA	HAT	CATEPSINAS	ADAM17
ALTO	X	-	X	-	X (H)	X
MEDIO	-	X	-	X	X (B-F)	-
BAJO	-	-	-	-	X (H-K-W)	-

De entre las PADs expresadas en este grupo celular la que tiene mayor importancia en cuanto a la detección es principalmente la isoforma 4 frente al resto de isoformas conocidas.

La expresión de CD26/DPP-4 en comparación con la del neumocito tipo 1 es significativamente mayor en este grupo celular, con niveles de expresión comparables a los de la proteína A2 del surfactante o los de NAPSA, proteínas características y de alta especificidad que señalan un origen pulmonar. Este hecho se sugiere que explica, al igual que sucedía con la ACE2 y la TMPRSS4, una mayor susceptibilidad de este grupo celular por la infección por SARS-CoV2.

Por último, en este grupo celular la presencia del CD147 (basigina) es moderada, al igual que sucede en las células alveolares tipo 1.

5.5.3 GRANULOCITOS

En el pulmón, las células alveolares tipo 1 y 2 infectadas por SARS-CoV2 liberan citoquinas e interleucinas que atraen la acción de los neutrófilos. Aunque la mayoría de funciones las realizan frente a infecciones bacterianas y fúngicas, existe evidencia de que los neutrófilos pueden desarrollar actividad antiviral cuando interactúan con otras células inmunes. Para ello internalizan los virus, liberan citoquinas, degranulan su contenido con sustancias oxidativas y tienden trampas para atrapar patógenos (NETs) [82].

Aunque previamente se había descrito que la presencia de neutrófilos jugaba un papel relevante en el desarrollo de síndrome de distrés respiratorio agudo (SARS) provocado por el virus influenza [83], en el caso del COVID-19 se ha descrito también cómo la acumulación de

neutrófilos en el epitelio bronquial y en alveolos genera moléculas tóxicas que también pueden contribuir a la fisiopatología del SARS [84]. De entre estas moléculas tóxicas destacan los radicales superóxido, especies reactivas de oxígeno (ROS), proteasas y elastasas que contribuyen a formar un ambiente de estrés oxidativo y, secundariamente, una tormenta expresión de citoquinas proinflamatorias y factores procoagulantes que son responsables de los casos graves de la infección por SARS-CoV2 [85,86].

En uno de los estudios consultados [87] se realizó un análisis bioinformático a partir de una base de datos de microarrays a partir de muestras de células mononucleares de sangre periférica en 10 casos positivos para SARS-CoV2 y 10 controles sanos. Los resultados del grupo de casos mostraron una sobreexpresión significativa de proteínas como ELANE (una elastasa del neutrófilo), ARG1 (arginasa 1) y CXCL1 (*chemokine C-X-C ligand*), planteando en dicho estudio la hipótesis de que estas moléculas estuvieran detrás de la neutrofilia detectada en la COVID-19 y los fenómenos inflamatorios y hemorrágicos a nivel alveolar.

Sin embargo, más allá del papel inmunológico de los granulocitos, la literatura consultada coincide en que la regulación efectuada por el sistema inmune adaptativo parece relevante en el devenir de los pacientes infectados por SARS-CoV2 y en la aparición de los casos graves de enfermedad [84-88].

Tras consultar en “The Human Protein Atlas”, observamos una nula expresión de la ACE2 y TMPRSS2 en los granulocitos. TMPRSS4 aparece escasamente expresada en el basófilo en sangre periférica, cuyo papel inmunológico en la COVID-19 es desconocido.

El receptor de membrana CD147 aparece expresado de forma moderada en los granulocitos presentes en el tejido pulmonar y en sangre periférica su expresión es mayor en neutrófilos y en eosinófilos, por lo que podría jugar un papel interesante como mediador de la inflamación neutrofílica y eosinofílica.

La furina aparece moderadamente expresada en los granulocitos del tejido pulmonar y a nivel sanguíneo presentan una mayor expresión si cabe. De entre los granulocitos en sangre periférica los eosinófilos son quienes más expresan la furina, por delante de basófilos y neutrófilos.

Tabla 9. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los granulocitos pulmonares. TMPRSS2: transmembrane protease serine 2. TMPRSS4: transmembrane

protease serine-4. HAT: Human Airway Trypsin-like protease. ADAM17: ADAM metallopeptidase domain 17.

<u>GRADO DE EXPRESIÓN</u>	<u>TMPRSS2</u>	<u>TMPRSS4</u>	<u>FURINA</u>	<u>HAT</u>	<u>CATEPSINAS</u>	<u>ADAM17</u>
ALTO	-	-	-	-	X (G)	-
MEDIO	-	-	X	-	X (D-F-W)	-
BAJO	-	-	-	-	X (A-B-C-E-H-K-L-O)	-

En el caso de las catepsinas, hay que diferenciar las que aparecen expresadas en los granulocitos del tejido pulmonar y los de sangre periférica. Principalmente las catepsinas D-F aparecen expresadas de forma moderada en ambas localizaciones. Las catepsinas A-B-C-E-H-K-L-O tienen una baja expresión en ambas localizaciones. La catepsina G presenta una expresión elevada y prácticamente exclusiva en los granulocitos que forman parte del pulmón, con expresión moderada en los neutrófilos periféricos, por lo que es probable que pueda tener relevancia en la fisiopatología del SARS-CoV2. Con la catepsina S existe moderada expresión en los neutrófilos en sangre periférica y escasa en los granulocitos pulmonares, justamente lo contrario que sucede con la isoforma W.

ADAM17 se expresa de forma elevada en sangre periférica en el basófilo y de forma moderada en el neutrófilo, sin apenas expresión en los granulocitos del tejido pulmonar.

ELANE aparece expresada significativamente en los neutrófilos en sangre periférica, al igual que ARG1 y CXCL-1, sin apenas expresión en los granulocitos del tejido pulmonar.

Por último, destacamos la expresión alta y característica de la isoforma 2 de la PAD en granulocitos pulmonares y en los periféricos, principalmente los neutrófilos. También es destacada la expresión de la isoforma 4, aunque ligeramente menor a nivel pulmonar.

5.5.4 MACRÓFAGO ALVEOLAR

La participación del macrófago alveolar en la infección por SARS-CoV2 se ha estudiado partiendo del fundamento de que son células del sistema inmune, al igual que las células dendríticas, que expresan ACE2 [89,90] levemente y este hecho puede condicionar una mayor susceptibilidad de estas células de ser infectadas y destruidas por el SARS-CoV2. Por otro lado, los macrófagos también expresan furina y TMPRSS2, al

menos en estudios de modelos animales [91,92], implicadas en la unión del virus, así como ADAM17 que participa en la invaginación de las vesículas que contienen el virus. En presencia de todos estos componentes el virus puede replicarse en los macrófagos alveolares, generando una producción desproporcionada de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias.

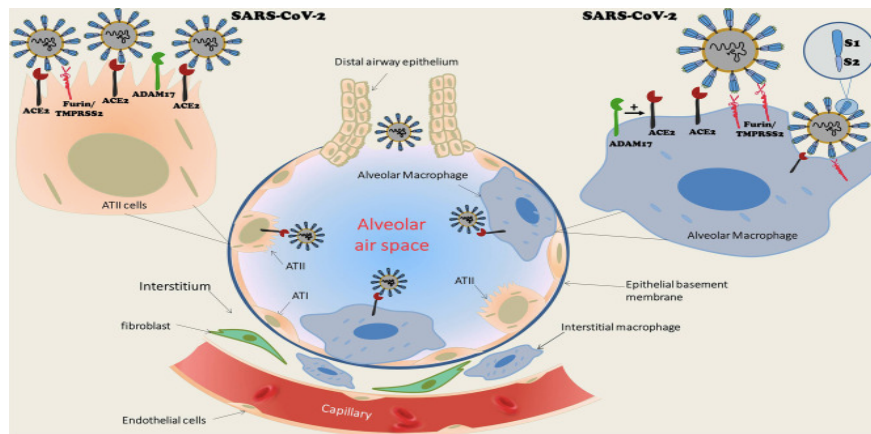


Figura 21. Tomado de [89]. Esquema del alveolo con los diversos tipos celulares. Los macrófagos alveolares expresan ACE2 además de TMPRSS2/Furina. Aunque la replicación del SARS-CoV2 en neumocitos tipo 2 está bien descrita, la replicación en macrófagos alveolares no se había descrito ni confirmado. ATII: neumocitos tipo 2.

En uno de los estudios consultados [93] los investigadores proponían una hipótesis sobre la posibilidad de que, pese a la actividad antiviral que ejercen los macrófagos, en el caso de la infección por SARS-CoV2 pueden comportarse como caballos de Troya al contener en su interior viriones que pueden infectar otras células diana en otros tejidos si se produce la traslocación de estos macrófagos residentes infectados al torrente circulatorio. Dicha hipótesis ha sido apoyada por un estudio en el que se evidenciaba la expresión de ACE2 y proteína viral de la nucleocápside en macrófagos CD169 en ganglios linfáticos y en bazo [94].

Al consultar en “The Human Protein Atlas”, a diferencia de la bibliografía consultada no podemos confirmar expresión de la ACE2, ni TMPRSS2 ni TMPRSS4 en macrófagos humanos.

El receptor de membrana CD147 aparece expresado de forma moderada en los macrófagos alveolares y también de forma moderada en los monocitos circulantes, por lo que puede ser también otra de las puertas de entrada del SARS-CoV2 no descritas con anterioridad.

La furina aparece moderadamente expresada en los macrófagos alveolares y a nivel sanguíneo de forma leve-moderada en los monocitos.

En el caso de las catepsinas las isoformas B-C-D-L-P aparecen expresadas de forma significativa en los macrófagos alveolares, mientras

que las catepsinas H-K-O presentan una expresión moderada en dichos macrófagos. El resto de catepsinas A-E-S-G-V-W tienen una baja expresión.

ADAM17 se expresa de forma elevada en los macrófagos alveolares y de forma moderada en los monocitos circulantes.

Tabla 10. Cuadro resumen de la expresión de las diferentes proteasas en los macrófagos alveolares. TMPRSS2: transmembrane protease serine 2. TMPRSS4: transmembrane protease serine-4. HAT: Human Airway Trypsin-like protease. ADAM17: ADAM metallopeptidase domain 17.

GRADO DE EXPRESIÓN	TMPRSS2	TMPRSS4	FURINA	HAT	CATEPSINAS	ADAM17
ALTO	-	-	-	-	X (B-C-D-L-P)	X
MEDIO	-	-	X	-	X (H-K-O)	-
BAJO	-	-	-	-	X (A-E-S-G-V-W)	-

Con respecto a las PAD hay que destacar la expresión significativa de la isoforma 4 en los macrófagos alveolares y en monocitos circulantes. En el caso de la isoforma 2 la expresión es moderada en macrófagos alveolares y apenas existe expresión de las otras isoformas.

5.5.5 LINFOCITOS

En el estudio de la expresión proteica de los linfocitos al consultar en “The Human Protein Atlas” observamos que estas células aunque no expresan ACE2 o proteasas como TMPRSS2, TMPRSS4 o furina, sí que presentan una expresión característica del receptor de membrana CD147 (basigina). Este receptor, como se comenta en anteriores apartados, se ha estudiado como una puerta de entrada alternativa que puede tener el SARS-CoV2 para invadir este grupo celular.

Existe literatura donde se describe que la presencia de una clase de proteínas conocidas como ciclofilinas juega un papel muy importante en la replicación de virus RNA como virus influenza A, VIH, VHC y el virus del papiloma humano [96]. Existen varios tipos de ciclofilinas en el organismo humano, siendo la ciclofilina A (CyPA) la isoforma más abundante y dominante. Se trata de proteínas con múltiples funciones reconocidas como la señalización celular, síntesis proteica o metabolismo [97].

Durante la infección por SARS-CoV, el CD147 funciona con un mecanismo similar al de la infección por VIH-1. En la infección por VIH-1 la CyPA de las células huésped incorporan el virus naciente mediante la interacción con la proteína Gag del VIH-1. A medida que el virus madura en el interior celular libera la proteína Gag y la CyPA queda redistribuida en la superficie del virus, facilitando su adhesión con el resto de células diana y la interacción con receptores de membrana expresados por otras células huésped.

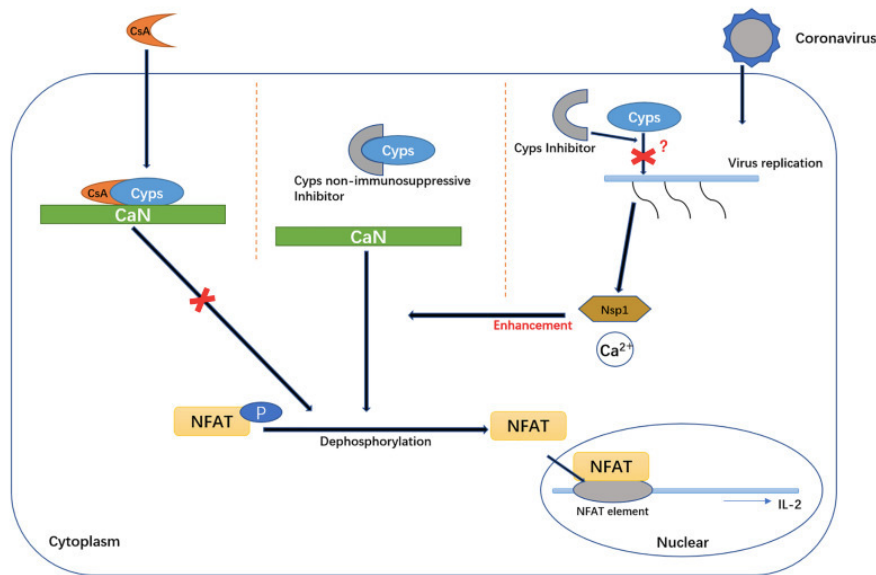


Figura 22. Tomado de [97]. Descripción del papel jugado por CyPA en la vía de señalización del NFAT y la replicación de los coronavirus. El complejo formado por CsA-CyPA puede inhibir la actividad fosforilativa de la calcineurina y, secundariamente, inhibir la transcripción de algunas citoquinas como la IL-2 mediante la defosforilación del NFAT. La proteína viral Nsp1 puede estimular la actividad del NFAT aumentando la concentración de Ca^{2+} . CaN, calcineurina; CsA, ciclosporina A (antagonista de CyPA); CyPA, ciclofilina A; Nsp1, non-structure protein 1; NFAT, nuclear factor of activated T cells

En el caso de la infección por SARS-CoV el virus interactúa con la CyPA mediante la proteína N, jugando CD147 un papel destacado en facilitar la entrada en la célula [98]. Una vez en el interior es posible que el proceso de maduración se acompañe de un revestimiento de la superficie viral por CyPA y que cuando el virus maduro salga de la célula tenga una tropismo nuevo por células que expresan CD147 [99].

En “The Human Protein Atlas” al estudiar la expresión de ciclofilinas en los linfocitos se observa una expresión aumentada de las isoformas 1, 3 y 4, principalmente en TCD4+ naive y en los B memoria, ya que son los que tienen que movilizar su maquinaria génica para sintetizar citoquinas y

comunicar al resto de células inmunes una respuesta inmunodirigida frente al antígeno.

Para finalizar, un detalle que ha llamado la atención ha sido la presencia de expresión elevada de catepsina W en los linfocitos TCD8+ memoria y en los TCD8+ naive. Sobre dicha expresión se desconoce implicación fisiopatológica actualmente en la enfermedad.

8.5 CÉLULAS NATURAL KILLER

En la infección por SARS-CoV2 los estudios mostraron una disminución en la cantidad de las células NK periféricas [100] y una sobreexpresión de NKG2A que viene inducida por la presencia de la Spike viral [101].

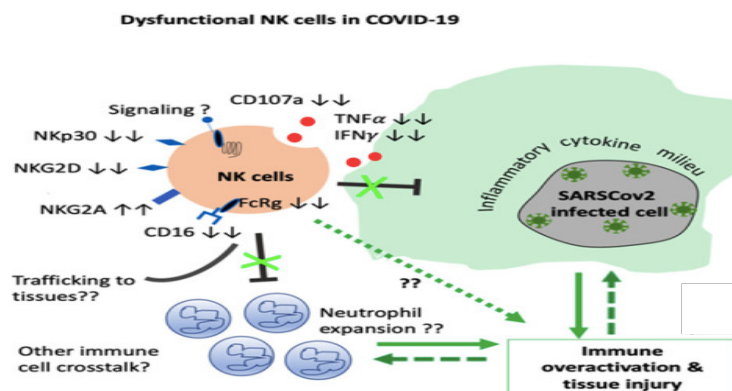


Figura 23. Tomado de [101]. Papel destacado de las células NK en la COVID-19. Las NK en pacientes con COVID-19 presentan menor expresión de receptores activadores como Nkp30, NKG2D, NKG2C, CD16 y el receptor Fc de la cadena y de la IgG (FcRγ). También aumentan la expresión de receptores inhibidores como NKG2A. La consecuencia es una menor capacidad para degranulación y síntesis de citoquinas, lo cual puede alterar la actividad de otras células inmunes y favorecer la activación hiperinmune y el daño tisular

Dicha sobreexpresión de la NKG2A permite mantener una tolerancia inmunológica en el tejido pulmonar infectado por SARS-CoV2 ya que interactúa con el antígeno E del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-E) en la superficie del epitelio alveolar y mantiene a la célula NK en estado inactivo. Algunos autores [102] sugieren que la expresión de la NKG2A puede ser fundamental para generar una actividad inmunológica disfuncional en los pacientes con COVID-19, impidiendo la comunicación entre estas células y los neutrófilos. El INF-γ secretado por las células NK activadas funciona como una citoquina antiviral y es importante para limitar la expansión de los neutrófilos y el daño tisular mediado por sus enzimas. En el caso de la sobreexpresión de NKG2A la célula NK se mantiene inactiva, no secreta IFN-γ y, por tanto, no se altera la actividad neutrofílica, perpetuándose el daño alveolar [103].

En “The Human Protein Atlas”, al igual que sucedía con la estirpe celular de los linfocitos, las células NK no expresan ni ACE2 ni las proteasas, pero expresan significativamente la CD147, por lo que la susceptibilidad a la infección por SARS-CoV2 también tiene aplicación en estas células.

En el caso de las catepsinas destaca la expresión en las células NK de las isoformas O-V-W, aunque se desconoce qué relevancia fisiopatológica puede tener en la enfermedad.

5.5.7 FIBROBLASTOS

Los fibroblastos son las principales células que habitan el intersticio pulmonar, donde gracias a la síntesis de fibras de colágeno y elastina permiten mantener las características fibroelásticas del tejido pulmonar. Dichas propiedades en el pulmón son muy importantes para que la mecánica ventilatoria sea correcta y las leyes de deformación elástica que actúan en el parénquima permitan mantener una correcta homeostasis y fisiología del intercambio gaseoso.

Estas células aunque no forman parte del sistema inmune como las anteriores han cobrado protagonismo en la COVID-19 principalmente por los efectos secundarios a medio-largo plazo que se derivan del daño alveolar difuso que acontece en la enfermedad. Los estudios anatomopatológicos [104] han mostrado depósito fibrinoide intersticial e intra-alveolar así como infiltrados crónicos inflamatorios semanas después del diagnóstico de la enfermedad. Esta respuesta reparativa puede considerarse fisiológica hasta cierto punto, pero si hay consecuencias clínicas, radiológicas o funcionales puede ser patológica [105].

Al menos se conoce que la infección por coronavirus puede causar fibrosis pulmonar por al menos dos mecanismos. La proteína de la nucleocápside del SARS-CoV1 puede estimular la secreción del TGF- β , inductor de respuestas profibróticas en los fibroblastos [106]. En el caso del SARS-CoV2, aunque se desconoce si el mecanismo es el mismo, comparte un 90% de homología a nivel de dicha proteína. Por otro lado, los coronavirus parecen disminuir la síntesis de la ACE2, disminuyendo el aclaramiento de la angiotensina II a nivel pulmonar. La presencia de mayores niveles de angiotensina II puede inducir la síntesis de TGF- β y de factores de crecimiento del tejido conectivo [107]. También se ha visto que, en los casos severos de COVID-19, el SARS-CoV2 estimula una respuesta inmunológica crónica mediada por el TGF- β , que es expresado por linfocitos TCD4+ y células plasmáticas, por lo que el propio sistema inmunológico es

también el responsable de perpetuar esta respuesta reparativa que puede ser exagerada [108].

En este sentido, la literatura consultada no identifica al fibroblasto como una célula diana del SARS-CoV2 y no le da un papel destacado en la fase aguda de la infección, sino más bien en fases tardías donde la respuesta reparativa es la protagonista. Es más bien la influencia del SARS-CoV2 en las células del sistema inmune adaptativo y la conocida “tormenta de citoquinas” que se describe en la literatura la que se sugiere que puede modular la función reparativa del fibroblasto y el miofibroblasto intersticial.

En “The Human Protein Atlas” se ha analizado la expresión de ACE2 y de las proteasas, constatando una ausencia de expresión proteica. Sin embargo, llama la atención la expresión significativa en el parénquima pulmonar del receptor CD147, hecho cuya relevancia fisiopatológica se desconoce a día de hoy.

Respecto a las catepsinas, la isoforma V en fibroblastos pulmonares presenta una expresión significativa.

Respecto a las PAD apenas hay expresión proteica en estas células.

5.6 DESCRIPCIÓN Y COMPARACION DEL PROTEOMA DE LOS MODELOS CELULARES EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS

El estudio de la expresión proteica en las células infectadas puede ser una estrategia para investigar vías destacadas de señalización en la patogenicidad del virus. Uno de los primeros modelos celulares en el que se pudo aislar con éxito el SARS-CoV2 fue el de las líneas celulares humanas de carcinoma colorrectal Caco2 [109]. Para realizar el análisis del proteoma recientemente se ha desarrollado un método denominado mePROD (*multiplexed enhanced protein dynamics*) que permite determinar los cambios en el transactoma y el proteoma con una resolución temporal elevada [110]. En este sentido, el uso de isótopos estables con marcaje de aminoácidos en los cultivos celulares puede permitir un estudio de la respuesta de estas células a la infección viral.

En uno de los estudios consultados [111] se infectaron células Caco-2 con SARS-CoV2 y se evaluaron los cambios en el transactoma y el proteoma mediante el método mePROD. Se utilizó el perfil de expresión media de las proteínas virales cuantificadas como el de referencia y, para las proteínas expresadas por la célula huésped, se calculó la distancia frente a dicha referencia. Una vez calculada la distancia se realizó un análisis de proximidades del cuantil del 10% de los perfiles más cercanos. Dicho

análisis mostró un aumento significativo de la maquinaria traduccional del huésped así como de otros mecanismos como el de splicing o síntesis de nucleótidos (figura 24).

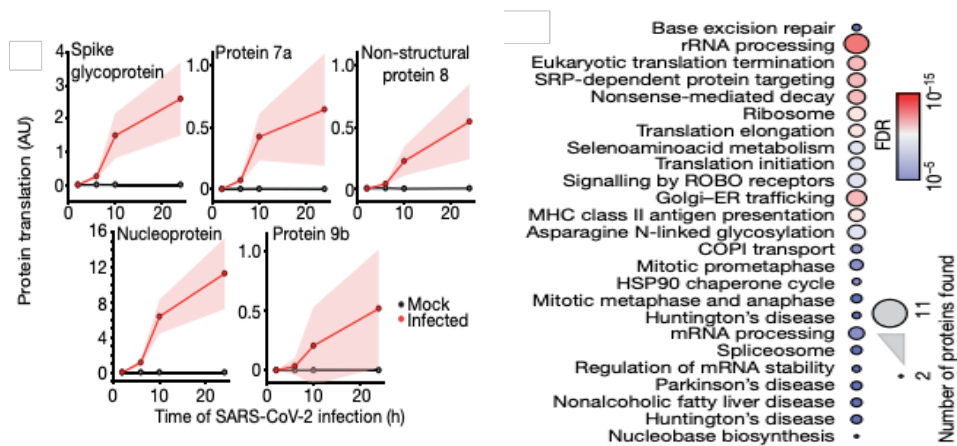


Figura 24 Tomado de [111]. Cambios traduccionales en la célula huésped después de la infección por SARS-CoV2. En la figura de la izquierda se observa la dinámica de traducción de las proteínas virales en relación con el tiempo de infección comparando las líneas celulares control (mock) con las infectadas. La figura de la derecha es un análisis de reactoma del 10% top expresado de las proteínas tras expresión génica viral. Los resultados de las vías se muestran con el número de proteínas encontradas en el dataset y el FDR (tasa de falsos positivos) computado de los análisis de enriquecimiento.

Por otro lado se hizo un análisis jerárquico de conglomerados (*clusters*) para identificar clusters de proteínas que mostraban diferencias de expresión. El primer cluster fueron proteínas infraexpresadas en la infección y estuvo formado por proteínas implicadas en el metabolismo del colesterol. El segundo cluster fueron proteínas sobreexpresadas en la infección y estuvo formado por componentes del spliceosoma y proteínas modificadoras del RNA (figura 25).

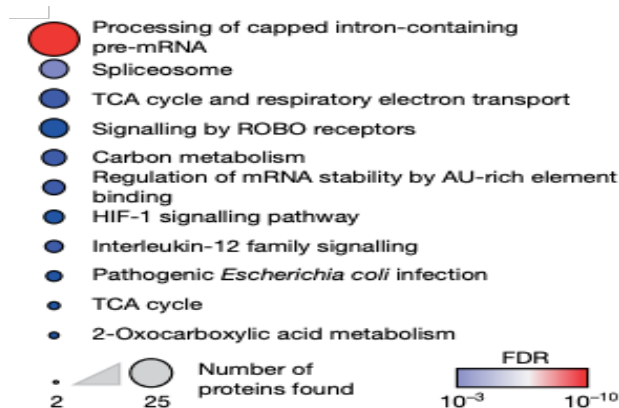


Figura 25. Tomada de [111]. Análisis del reactoma del cluster de proteínas sobreexpresadas después de la infección por SARS-CoV2. Los resultados de las vías se

muestran con el número de proteínas encontradas en el dataset y el FDR (tasa de falsos positivos) computado de los análisis de enriquecimiento.

El estudio de los perfiles de expresión proteica en la infección por SARS-CoV2 también se ha podido estudiar en otros modelos celulares. En otro de los estudios consultados se analizaron los perfiles de expresión de líneas celulares de Vero E6, Calu-3 y ACE2-A549 [112]. La monitorización de los cambios del proteoma mediante la técnica de espectrometría de masas (MS), en un contexto infeccioso viral, pudieron mostrar cambios significativos de expresión que incluían factores reguladores de la transcripción, inhibidores de proteasa y proteínas relacionadas con la inmunidad innata.

Este tipo de tecnología de la MS y estudios de inmunohistoquímica han permitido la elaboración de un mapa de interacción proteica (interactoma) que ofrece una visión general de cómo las proteínas del SARS-CoV2 interactúan con las proteínas del huésped [113].

En primer lugar, en el estudio de *Zecha J, et al* [112] los investigadores realizaron un análisis de expresión proteica mediante técnicas de inmunofluorescencia a partir de líneas celulares de Caco-2 (*human epithelial colorectal carcinoma cell line*), Calu-3 (*human epithelial lung cancer cell line*), Vero E6 (*epithelial renal cell line*) del mono verde africano y ACE2-A549 (*human alveolar basal epithelial adenocarcinoma cell line*), con expresión en este último caso de la ACE2 de forma estable. En las líneas celulares se estudió particularmente la expresión de las principales proteínas implicadas en la entrada del SARS-CoV2: ACE2, TMPRSS2, TMPRSS4, CTSB, CTSL, BSG y FURIN (figura 26).

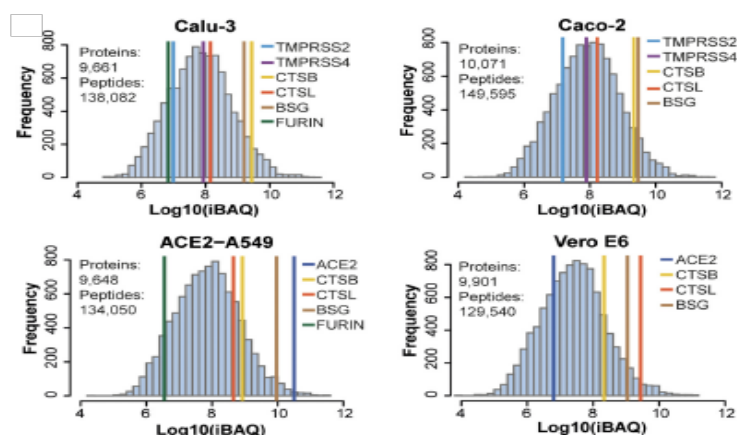


Figura 26. Tomada de [112]. Perfiles de expresión proteica de las cuatro principales líneas celulares empleadas en el estudio de la infección por SARS-CoV2. Se observa la distribución de la expresión proteica de las proteínas implicadas en la fisiopatología de la infección por SARS-CoV2, en las líneas celulares humanas Calu-3, Caco-2, ACE2-A549 y VeroE6 en las líneas celulares de mono africano verde.

En el caso de las líneas celulares de Vero E6, pese a no ser un modelo fisiológico se emplea de forma habitual en investigación virológica dada su incapacidad para elaborar una respuesta antiviral eficaz. En el estudio consultado de *Zecha J, et al* [112] los investigadores infectaron las células VeroE6 con diferentes dosis de SARS-CoV2 y estudiaron el proteoma unas 24h después. El estudio permitió observar los cambios en la expresión de aproximadamente 1500 proteínas del huésped de forma estadísticamente significativa. Estas proteínas se agruparon en 6 conglomerados de acuerdo con el comportamiento de la expresión en tres condiciones experimentales (infección con 3 dosis diferentes de inóculo de SARS-CoV2). De entre las proteínas que manifestaron cambios significativos se encontraban factores reguladores de la transcripción, proteínas de la inmunidad innata, proteínas implicadas en la entrada viral, inhibidores de proteasa y miscelánea (figura 27).

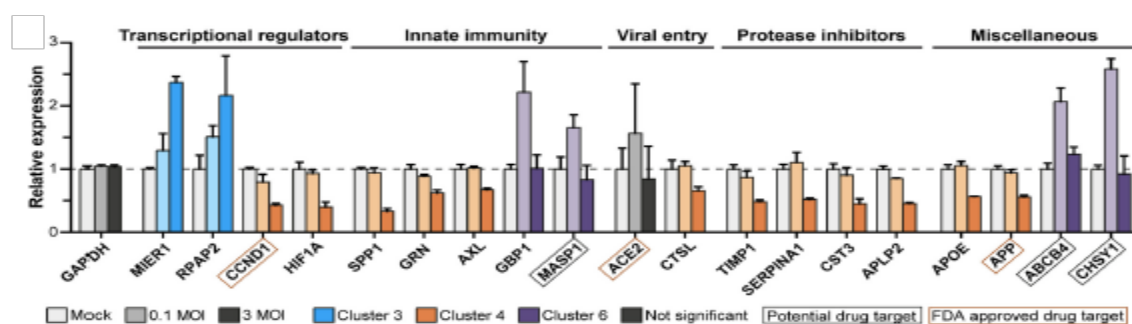


Figura 27. Tomada de [112]. Proteoma de Vero E6 tras la infección por SARS-CoV2. Dichas células se infectaron con dos inóculos de SARS-CoV2 o MOI (Multiplicity Of Infection). Mock constituye el grupo control. La línea de puntos indica una situación sin cambios.

De entre las proteínas destacadas que tuvieron cambios significativos de expresión están los factores de transcripción MIER1 y RPAP2, que regulan la actividad de la RNA polimerasa II, y las proteínas GBP1 y MASP1 implicadas en inmunidad innata, siendo la segunda de ellas una endopeptidasa relevante en el sistema del complemento.

En cualquier caso, un aspecto interesante del estudio del proteoma en modelos celulares es que se abordan fundamentalmente los cambios cuantitativos en la expresión, pero también puede permitir el estudio de las modificaciones post-traduccionales que el virus ejerce sobre el huésped. Dichos cambios, principalmente en lo que respecta a patrones de glicosilación de los productos proteicos, pueden representar un campo de

estudio porque es posible que el patrón de glicosilación de las proteínas de superficie determine el tropismo del SARS-CoV2.

6. DISCUSIÓN

La infección por SARS-CoV2 ha sido catalogada como una pandemia, provocando consecuencias devastadoras en los sistemas sanitarios nacionales y en el ámbito socioeconómico, sin precedentes recientes que puedan permitir comparaciones dada la magnitud del impacto.

Se trata de una infección característica si la comparamos con el resto de infecciones respiratorias descritas en la literatura médica, por el número de casos descritos, la curva de contagio y por una mayor proporción de casos graves subsidiarios de ingreso en las Unidades de Cuidados Intensivos dado el fracaso respiratorio y multiorgánico de los individuos.

Mucho se ha hablado acerca de los mecanismos fisiopatológicos detrás del fracaso multiorgánico en estos pacientes, de la famosa “tormenta de citoquinas”, de la disregulación del sistema inflamatorio y hemostático, de los elementos de susceptibilidad del huésped y de los factores pronósticos de la COVID-19.

Se han realizado estudios de secuenciación masiva del SARS-CoV2 para obtener información fidedigna de su estructura genética básica, de sus mecanismos de transcripción y traducción, así como de sus productos de expresión proteica, comparando con lo que disponíamos hasta la fecha como modelos virológicos: las epidemias del MERS y del SARS-CoV.

Se ha estudiado el ciclo infectivo del virus partiendo de modelos celulares humanos y animales, describiendo mediante técnicas inmunohistoquímicas y análisis proteómico con herramientas bioinformáticas las consecuencias en la maquinaria transcripcional y traduccional del huésped. Se han descrito cambios cuantitativos en la expresión proteica y se han caracterizado la funcionalidad de las proteínas diferencialmente expresadas. Todo ello con la intención de describir mejor el modo de penetración del virus en el huésped, la susceptibilidad del mismo y el uso que hace de la estructura sintética del huésped para activar su replicación.

En el presente trabajo se ha realizado un análisis sobre los elementos del virus que pensamos pueden ser diferenciales, comparando con los elementos de los otros virus de los que disponíamos información (MERS y SARS-CoV). Hemos comparado las principales proteínas implicadas en el

ciclo infeccioso del SARS-CoV2, atendiendo especialmente a la proteína S Spike, herramienta principal que utiliza para internalizarse en la célula huésped y poner en marcha la replicación de su genoma. No hemos dejado de lado tampoco la importancia del dominio de unión al receptor (RBD), la RNA polimerasa-RNA dependiente (RdRp) y la proteasa vírica.

El estudio de la proteína S y la comparación de su estructura en los 3 coronavirus nos permite proponer la idea de que esta proteína se comporta realmente como dos proteínas S1 y S2 unidas por una región S1/S2 sobre la que actúan las proteasas de la célula huésped, y que el RBD con el que se ancla a la ACE2 del huésped presenta dos estados conformacionales (activo e inactivo).

En la comparación entre los tres coronavirus existe una homología mayor entre los SARS-CoV y menor si los comparamos con el MERS. Cuando hemos realizado una comparación de las secuencias tomando la proteína S2 y el RBD como modelos los hallazgos son similares a los de la proteína S: se mantiene una homología elevada entre los SARS-CoV y el MERS queda aparte. Este hecho refrenda la hipótesis de los estudios filogenéticos en la literatura biomédica acerca del origen de estos tres coronavirus, donde se sugiere la presencia de un virus ancestral de origen animal (murciélago y pangolín) a partir del cual, mediante fenómenos de recombinación genética y mutaciones, han surgido por un lado el MERS y por otro lado el SARS-CoV y el SARS-CoV2.

En nuestro trabajo dicha hipótesis podría adquirir mayor fortaleza cuando realizamos la comparación entre otras proteínas más implicadas en funciones básicas como la replicación viral. Tal es el caso de la RdRp y la proteasa viral, donde la homología entre los tres coronavirus es ligeramente mayor de forma global que cuando nos centramos en la proteína S Spike. Es posible sugerir que existe una mayor conservación genética en la maquinaria de replicación de los coronavirus y que las diferencias entre ellos radican principalmente en la proteína S, es decir, en los mecanismos de interacción de cada coronavirus y en la capacidad infectiva de cada uno. Dicho de una forma más simplista, los tres coronavirus utilizan elementos parecidos para replicarse pero se diferencian en los elementos de interacción con el entorno, al menos en cuanto a la proteína S y al menos los SARS-CoV con el MERS.

Se ha realizado un estudio de la inmunogenicidad de la proteína S Spike en los tres virus, tomando como elementos de comparación tres fragmentos de la proteína S: RBD, fragmento S2 y fragmento S1. Se han

constatado similitudes en las regiones de potenciales epítomos entre los SARS-CoV, con mayor conservación en el RBD y en el fragmento S2 pero menor conservación en el fragmento S1. En el caso del MERS todavía era menor la conservación en estas regiones si lo comparamos con los SARS-CoV. Al comparar algunas de las regiones señaladas de potenciales epítomos en el fragmento S1 y en el S2 entre los tres coronavirus se observó una mayor homología entre SARS-CoV2 y MERS en S1, siendo escasa en S2. En este sentido es posible pensar que S1 pueda constituir un fragmento fuertemente inmunógeno en el SARS-CoV2, de forma similar al MERS, compartiendo quizás los aspectos más virulentos del mismo.

Por otro lado, se ha observado una mayor concentración de dichas regiones de potenciales epítomos en las regiones donde probablemente se produzca la fragmentación de la proteína S en S1/S2, quedando expuesta la S1 con estos epítomos para que el sistema inmunológico la pueda identificar y crear una respuesta específica.

Estos potenciales epítomos a lo largo de los fragmentos analizados explican una de las razones para que el estudio y la producción de vacunas específicas se haya centrado en esta proteína S. Otras de las razones probablemente subyace en el hecho de que no existe otra proteína en el virus tan expuesta como esta y, hasta la fecha, no hay descritas otras proteínas en la superficie viral que jueguen un papel relevante en la capacidad del virus para fusionar su membrana con la de la célula huésped e internalizarse en ella.

Además de centrar el estudio en los elementos proteicos virales el trabajo se ha centrado en estudiar las interacciones que el virus presenta con la célula huésped. A lo largo de la literatura médica se recoge la esencialidad del receptor ACE2 como puerta de entrada en la célula del SARS-CoV2. Se ha estudiado en el trabajo el complejo RBD-ACE2, constatando las interacciones bioquímicas que se establecen entre ambas proteínas y observando mutaciones puntuales en la estructura de la proteína S Spike que pueden guardar relación con el establecimiento de enlaces bioquímicos más numerosos y más estables en el caso del SARS-CoV2 en comparación con el resto de los virus.

A la hora de estudiar la expresión de la misma en las células de la vía respiratoria inferior y en el tejido pulmonar no sorprende encontrar una expresión significativa de la misma, pero sí que llama la atención por la experiencia clínica en los casos de enfermedad, la diferente expresión clínica y gravedad encontrada en los pacientes con niveles de expresión

muy probablemente similares. Es posible que existan otros mecanismos que justifiquen esta heterogeneidad fenotípica encontrada en la COVID-19.

Una de las hipótesis más aceptadas actualmente centra la sospechas en la disregulación que presenta el sistema inmunológico hacia respuestas proinflamatorias desadaptadas y exageradas. No obstante, quizás también un mecanismo detrás de esta heterogeneidad pueda subyacer en el perfil de susceptibilidad de la célula huésped. En este sentido uno de los aspectos más interesantes del trabajo ha sido el caracterizar las proteasas de la célula huésped y analizar la expresión de las mismas en las diferentes células descritas en la fisiopatología de la COVID-19.

Las expresión de diferentes proteasas en la célula huésped define la capacidad de la misma para, una vez se ha formado el complejo RBD-ACE2, fragmentar la proteína S en dos fragmentos para exponer el péptido de fusión de la proteína S y poder llevar a cabo la fusión de membranas y la entrada en la célula. Sobre el lugar de fragmentación S1/S2 es posible que actúen con diferente número y afinidad las proteasas del huésped y que, bien la expresión de algunas de las mismas, bien la combinación en la expresión de ellas, bien el efecto sinérgico ejercido por dos o más de ellas, puedan explicar la diferente susceptibilidad de los huéspedes a la infección por el SARS-CoV2. Este aspecto podría ser objeto de estudio de trabajos posteriores y quizás unas posibles dianas terapéuticas para dificultar la internalización del virus en la célula.

En este trabajo se ha estudiado la expresión del TMPRSS2, TMPRSS4, ELANE, FURIN, Catepsinas y ADAM17. Se han estudiado también las interacciones que establece la proteína S Spike con otras proteínas del huésped diferentes a la ACE2, con especial atención al CD147 (basigina), siendo esta una posible vía de entrada alternativa del virus en algunos pacientes. De hecho, es posible pensar que el grupo de pacientes más graves pueda tener activa una doble vía de entrada del virus en vez de la clásica RDB-ACE2.

El nivel de expresión de estas proteasas observado mediante la herramienta “The Human Protein Atlas” ha permitido destacar una expresión significativa del TMPRSS2 en los neumocitos tipo 1 y las células epiteliales bronquiales; de TMPRSS2, FURIN y ADAM17 en los neumocitos tipo 2.

Respecto a las células del sistema inmune innato y adaptativo también se ha descrito y caracterizado la expresión proteica de estas proteasas, destacando fundamentalmente los hallazgos en dos células clave en la

respuesta inflamatoria del huésped y en la generación de inmunidad frente al SARS-CoV2: el macrófago alveolar y los linfocitos.

El macrófago alveolar es un protagonista destacado en la COVID-19, con un protagonismo dividido entre el papel de víctima de la infección por el SARS-CoV2 y el papel de agresor del huésped, lo cual se ha propuesto en la literatura como la doble cara de la moneda del macrófago. Se ha podido describir una expresión significativa de proteasas como FURIN, TMPRSS2, ADAM17, CD147 y algunas catepsinas como la L, todo ello definiendo una susceptibilidad especial de esta célula a la infección.

Al mismo tiempo, se ha descrito una doble capacidad del macrófago alveolar para generar una respuesta inflamatoria primero mediante la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias y segundo mediante la presentación de antígenos virales al linfocito T para generar respuestas inmunes inespecíficas.

El segundo protagonista sin lugar a dudas en la COVID-19 es el linfocito T. Aunque todavía existe mucha incertidumbre sobre el papel de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, cada vez más estudios están centrando la atención en el papel de las células Treg y en los Th17, siendo la proporción de las mismas un elemento que puede ser clave en la inflamación tisular y el daño alveolar difuso en los pacientes. Como dato característico se observó en estas células una expresión destacada del receptor de membrana CD147, siendo células que en algunos pacientes pueden contribuir a una susceptibilidad a la infección y, en esa circunstancia, ser un elemento diferenciador hacia casos más graves de la enfermedad por pérdida su función protectora.

Otros actores en el reparto inflamatorio de la COVID-19 son las células NK, con funciones bien conocidas antivirales y que, en el caso de la infección por SARS-CoV2, se ha estudiado su grado de participación centrándose en los cambios en su proteoma. Por un lado la sobreexpresión del receptor inhibitor NKG2A y por otro la expresión destacada del CD147 en superficie pueden ser factores clave respectivamente en la inmunotolerancia ejercida durante la infección y en la susceptibilidad a la invasión por el SARS-CoV2.

Una vez atravesado el plano inflamatorio quedan las consecuencias a medio y largo plazo, por lo que la literatura está focalizando su atención en el fibroblasto para elaborar una respuesta reparativa tras el daño alveolar extenso descrito en la COVID-19. Se ha hablado en múltiples foros y se han

descrito casos clínicos acerca de las secuelas fibróticas de la enfermedad, con diferente repercusión clínica, funcional y de la calidad de vida de los pacientes. Aunque se ha estudiado el mecanismo fisiopatológico de las respuestas reparativas disfuncionales, se desconocen factores predictivos de dicha respuesta y el grado de susceptibilidad que pueden tener los pacientes hacia una respuesta reparativa igual de exagerada y desadaptada que la respuesta inflamatoria.

Se ha descrito de forma llamativa la expresión significativa del receptor CD147 en la superficie de los fibroblastos, pero se desconoce la relevancia fisiopatológica que pueda tener dicha expresión y si ello condiciona una respuesta reparativa desadaptada.

En este trabajo también se ha investigado acerca de los datos que arrojan los modelos celulares de infección empleados para describir los cambios en la expresión proteica inducidos por la infección por el SARS-CoV2. Por desgracia para el estudio de la infección viral se necesita del uso de modelos celulares que, pese a que se en algunos casos se aproximan al modelo del huésped natural humano, en otros pueden presentar leves diferencias con lo que sucede en la realidad.

No obstante, el uso de modelos de células Caco-2, Vero E6, Calu-3 y ACE2-A549 en algunos de los estudios consultados sirvió para hacerse una idea sobre los cambios que aparecían en la expresión proteica de células infectadas.

El uso de la tecnología de la espectrometría de masa y las técnicas bioinformáticas ha permitido corroborar algunas de las sospechas que se habían generado en las hipótesis de la fisiopatología de la COVID-19. Efectivamente existe una expresión significativa del receptor ACE2, de las proteasas TMPRSS2, TMPRSS4 y FURIN, del receptor CD147 y de algunas catepsinas como la B y la L en los modelos celulares anteriormente mencionados.

Otro de los aspectos destacados fue el de caracterizar en uno de los modelos los cambios en el proteoma. Dichos cambios se centraban en factores reguladores de la transcripción, proteínas implicadas en la entrada viral e inhibidores de proteasa. Es posible pensar que la infección por el SARS-CoV2 de una célula huésped esté utilizando la maquinaria transcripcional de la misma para generar nuevos viriones con nuevas funciones de sus proteínas, además de modificaciones estructurales, y diferenciarse del virus inicial formando nuevos fenotipos de virus. Por ejemplo un virión con capacidad de inhibir proteasas del huésped, otro con

una mayor capacidad para unirse a un huésped u otro con mayor capacidad para evadir los mecanismos inmunológicos de defensa antiviral.

Por último, y no por ello menos importante, hemos querido centrar un apartado destacado del trabajo en el estudio de posibles proteínas multifuncionales en la infección, tanto del SARS-CoV2 como del huésped.

En el caso del SARS-CoV2 quizás existan dos proteínas no estructurales con destacada multifuncionalidad como son la Nsp3 y la helicasa viral, con funciones dentro del proceso de replicación viral pero al mismo tiempo capaces de unirse a proteínas citoplasmáticas del huésped para bloquear respuestas proinflamatorias y no llamar la atención del sistema inmunológico sobre la célula infectada. Otra de las proteínas con destacada multifuncionalidad en el SARS-CoV2 sería la proteína estructural E, con funciones de ensamblaje del virus y, al mismo tiempo, capaz de inducir la apoptosis celular para poderse liberar el virus al exterior y perpetuar el proceso infeccioso en otros huéspedes.

En el caso de la célula huésped hemos querido destacar varias proteínas como el CD26/DPP-4, las PAD y las ciclofilinas.

El receptor de membrana CD26/DPP-4 se ha descrito su expresión fundamentalmente en el linfocito T y su estimulación puede ser clave en la polarización hacia respuestas Th1 o Th2. Se ha comentado mucho en la descripción de los casos más graves de la COVID-19 la hipótesis de si la respuesta T se encuentra desadaptada y mal acondicionada al patógeno intracelular SARS-CoV2. Llama la atención, contrario a lo que la comunidad científica pensaba en un primer momento, la cantidad de pacientes inmunocompetentes en un principio que han evolucionado hacia formas graves de la enfermedad y, por otro lado, la presencia de formas leves de enfermedad en pacientes aparentemente inmunocomprometidos desde el punto de vista celular o humoral.

Es posible pensar, hablando en términos simples, que gana mayor relevancia en el devenir de la COVID-19 la calidad de la respuesta inmunológica más que la cantidad de la misma, y que la presencia de una “tormenta” de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias no es ni más ni menos que el resultado de una disregulación del sistema inmunológico adaptativo que elabora una respuesta inadecuada, seguramente además de exagerada, frente a un patógeno en el que debería de formar otro tipo de respuestas menos agresivas. El CD26/DPP-4 es una proteína que puede ser clave en esta disfunción del linfocito T, promoviendo mecanismos de

señalización intracelular diversos según la función que pueda adoptar esta proteína dentro de las múltiples que se han descrito. También hay que incluir en este apartado de discusión el hecho de que se ha descrito que la subunidad S1 de la proteína Spike puede presentar interacciones con este receptor, potenciando la capacidad del virus para internalizarse en los linfocitos Th1 y eliminándolos del tablero inmunológico. Sin duda esta situación puede tener repercusiones clínicas en los pacientes y está por definir el escenario clínico y el papel de fármacos inhibidores de dicho receptor.

La familia de enzimas PADs, con múltiples funciones descritas en la literatura biomédica, es responsable principalmente de mecanismos de señalización intracelular y regulación de las modificaciones post-traduccionales. Precisamente la presencia de isoformas expresadas en diferentes tejidos y grupos celulares puede sugerir diferentes respuestas y manifestaciones en la COVID-19. En el caso de los granulocitos y los macrófagos alveolares se ha destacado la expresión de la isoforma 2, con implicaciones fisiopatológicas y pronósticas desconocidas, sin saber actualmente si el uso de fármacos moduladores de dicha isoforma pueden ser útil en el manejo de la enfermedad.

Para terminar, un grupo de proteínas que puede resultar novedoso en la fisiopatología del COVID-19 por el mecanismo de acción es el de las ciclofilinas. El modelo del SARS-CoV1 permitió identificar una interacción entre la proteína N del virus y la ciclofilina A, utilizando el virus como puerta de entrada el CD147, un modo alternativo de entrada frente al de la ACE2. En el caso del SARS-CoV2 las sospechas se han centrado en Nsp1, aunque faltan por definir nuevos estudios que refrenden dicha hipótesis. Por un lado una vez en el interior celular, las nuevas formas sintetizadas del virus se revisten de la ciclofilina A y cuando salen del huésped presentan un mayor tropismo frente a células que expresan CD147, pero por otro lado se estimula la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-2, por lo que se puede amplificar la respuesta inflamatoria.

Es posible pensar que existan otras isoformas implicadas en la infección y que algunas de ella predispongan en mayor o menor medida al ambiente inflamatorio y al tropismo por nuevos huéspedes. En este sentido también hace falta aportar evidencia para esclarecer más el papel de las ciclofilinas en la COVID-19 como se ha descrito en otros modelos de infección respiratoria como el virus influenza A.

En definitiva, no todas las formas de interacción entre el SARS-CoV2 y el huésped humano están completamente descritas y es plausible imaginar que gran parte de las formas letales de enfermedad en personas sin comorbilidades previas pueda guardar relación con los mecanismos alternativos de interacción virus-huésped y en las respuestas inmunológicas derivadas, con potenciales implicaciones pronósticas y farmacológicas.

7. CONCLUSIONES

1. El genoma del SARS-CoV2 expresa proteínas estructurales y no estructurales. Entre las proteínas estructurales destaca en superficie la proteína S Spike que lo capacita para interactuar con la célula huésped principalmente a través del receptor ACE2. Dicha proteína se compone de las subunidades S1 y S2, con un dominio de unión al receptor ACE2 y una región S1/S2 donde se fragmenta la proteína y se produce su activación.
2. Existe una homología elevada entre el SARS-CoV1 y el SARS-CoV2 en cuanto a la proteína S. Dicha homología es menor cuando comparamos la proteína S del MERS y es creciente entre los SARS-CoV a medida que realizamos el alineamiento global con la proteína S global, el dominio de unión al receptor y la subunidad S2.
3. La proteína S puede interactuar con otros receptores en el huésped como el CD147 o el CD26/DPP-4 y su activación depende de la afinidad de las proteasas del huésped por la región S1/S2. Algunas de las proteasas más destacadas son el TMPRSS2, TMPRSS4, furina, ADAM17, ELANE o las catepsinas. La diversidad y magnitud de expresión de las mismas en los tejidos puede definir el tropismo del virus y la virulencia del mismo.
4. El análisis mediante Bepipred demostró que la proteína S en tres de sus segmentos (dominio de unión al receptor, S1 y S2) presenta regiones de potenciales epítomos mayormente conservados entre los SARS-CoV y menor en el caso del MERS. En la subunidad S1 se predijeron numerosas regiones de potenciales epítomos en la zona donde se produce la fragmentación S1/S2 de la proteína S.
5. Existen proteínas con funciones moonlighting que podrían explicar la diversidad de presentaciones clínicas de la enfermedad y ser dianas terapéuticas tanto en el SARS-CoV2 (Nsp3, Helicasa, Exoribonucleasa y proteína E) como en las células huésped (CD26/DPP-4, PAD, TMPRSS2, TMPRSS4, furina y el CD147).

6. La caracterización del proteoma extracelular (enzimas, marcadores de coagulación, SERPIN..) puede ayudar a definir clusters de enfermos COVID y adecuar el manejo clínico-terapéutico.
7. La caracterización del perfil de expresión proteica en las principales células infectadas por el SARS-CoV2 podría definir aquellos grupos celulares con mayor tropismo por el virus. La expresión diferencial de las proteasas puede ayudar a determinar la susceptibilidad de los grupos celulares a la infección.
8. El perfil de expresión en las células huésped de las isoformas de proteasas como las PAD o las catepsinas podría ser un elemento diferenciador en cuanto a la susceptibilidad a la infección.
9. La respuesta inmunológica del sistema innato y adaptativo podría verse condicionada por el perfil de expresión de las proteasas y de los receptores de membrana ACE2, CD147 y CD26/DPP-4 en las células efectoras de dichas respuestas. En los fibroblastos podría definir la respuesta reparativa después de la enfermedad.
10. El estudio de la enfermedad en modelos celulares in vitro permite elaborar perfiles de expresión proteica y estudiar los cambios en la expresión, donde destaca el predominio de reguladores de la replicación, proteínas con función inmunológica y proteínas al servicio de la perpetuación del ciclo reproductivo viral.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV).2020.[https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov)) (accessed January 30, 2020)
2. Gabutti, G; d'Anchera,E; Sandri,F; Savio,M; Stefanati,A. Coronavirus: Update related to the current outbreak of covid-19. *Infect. Dis. Ther.* 2020, 9,1-13
3. Kakodkar,P; Kaka, N; Baig, M.N. A comprehensive literature review on the clinical presentation, and management of the pandemic coronavirus disease 2019 (covid-19). *Cureus* 2020, 12, e7560.
4. Li, Q.; Guan, X.; Wu, P.; Wang, X.; Zhou, L.; Tong, Y.; Ren, R.; Leung, K. S. M.; Lau, E. H. Y.; Wong, J. Y.; Xing, X.; Xiang, N.; Wu, Y.; Li, C.; Chen, Q.; Li, D.; Liu, T.; Zhao, J.; Liu, M.; Tu, W.; Chen, C.; Jin, L.; Yang, R.; Wang, Q.; Zhou, S.; Wang, R.; Liu, H.; Luo, Y.; Liu, Y.; Shao, G.; Li, H.; Tao, Z.; Yang, Y.; Deng, Z.; Liu, B.; Ma, Z.; Zhang, Y.; Shi, G.; Lam, T. T. Y.; Wu, J. T.; Gao, G. F.; Cowling, B. J.; Yang, B.; Leung, G. M.; Feng, Z. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382 (13), 1199–1207.
5. Liu, Y.; Gayle, A. A.; Wilder-Smith, A.; Rocklöv, J. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J. Travel Med.* 2020, 27 (2), taaa021.
6. Verity, R.; Okell, L. C.; Dorigatti, I.; Winskill, P.; Whittaker, C.; Imai, N.; Cuomo-Dannenburg, G.; Thompson, H.; Walker, P. G. T.; Fu, H.; Dighe, A.; Griffin, J. T.; Baguelin, M.; Bhatia, S.; Boonyasiri, A.; Cori, A.; Cucunuba, Z.; FitzJohn, R.; Gaythorpe, K.; Green, W.; Hamlet, A.; Hinsley, W.; Laydon, D.; Nedjati-Gilani, G.; Riley, S.; van Elsland, S.; Volz, E.; Wang, H.; Wang, Y.; Xi, X.; Donnelly, C. A.; Ghani, A. C.; Ferguson, N. M. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20 (6), 669–677.
7. <https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situationreports/20201012-weekly-epi-update-9.pdf>
8. Gralinski, L. E., and Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* 12, 135. doi: 10.3390/v12020135
9. de Wit, E.; van Doremalen, N.; Falzarano, D.; Munster, V. J. SARS and MERS: Recent Insights into Emerging Coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016, 14 (8), 523–534.
10. Petersen, E.; Koopmans, M.; Go, U.; Hamer, D. H.; Petrosillo, N.; Castelli, F.; Storgaard, M.; Al Khalili, S.; Simonsen, L. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and Influenza Pandemics. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20, e238.
11. Centers for Disease Control and Prevention SARS Basics Fact Sheet. <https://www.cdc.gov/sars/about/fs-sars.html> (accessed September 28, 2020).
12. World Health Organization Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/> (accessed September 28, 2020).
13. Md Insiat Islam, R. Current drugs with potential for treatment of covid-19: A literature Review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2020, 23,58-64.

14. Luo H, Tang QL, Shang YX, Liang SB, Yang M, Robinson N, Liu JP. Can Chinese Medicine Be Used for Prevention of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19)? A Review of Historical Classics, Research Evidence and Current Prevention Programs. *Chin J Integr Med.* 2020 Apr;26(4):243-250. doi: 10.1007/s11655-020-3192-6.
15. Huang, C., Gao, J., Luo, X., Feng, L., Chen, J., et al. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vertical Transmission in Neonates Born to Mothers With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia. *Obstetr. Gynecol.* 136,65-67. doi: 10.1097/aog.0000000000003926.
16. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant.* 2020 May;39(5):405-407. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012.
17. Jiang F, Deng L, Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) *J Gen Intern Med.* 2020 May 4;35(5):1545–1549. doi: 10.1007/s11606-020-05762-w.
18. Kui L, Fang YY, Deng Y, et al. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin Med J (Engl).* 2020. 10.1097/CM9.0000000000000744.
19. Singh A, Zaheer S, Kumar N, Singla T, Ranga S. Covid19, beyond just the lungs: a review of multisystemic involvement by Covid19 [published online ahead of print, 2021 Feb 16]. *Pathol Res Pract.* 2021;153384. doi:10.1016/j.prp.2021.153384
20. Fan H., Zhang L., Huang B., Zhu M., Zhou Y. Cardiac injuries in patients with coronavirus disease 2019: Not to be ignored. *Int J Infect Dis.* 2020;96:294–297. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.024.
21. Cheng Y., Luo R., Wang K., Zhang M., Wang Z., Dong L. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int.* 2020;97(5):829–838. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005.
22. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Nov 25;10:587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.
23. Chen Y, et al. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020; 292:418-423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
24. Peiris JS, Guan Y, Yuen KY. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nature medicine*, 10(12 Suppl), 88-97. <https://doi.org/10.1038/nm1143> .
25. da Silva SJR, Alves da Silva CT, Mendes RPG, Pena L. Role of nonstructural proteins in the pathogenesis of SARS-CoV-2. *J Med Virol.* 2020 Sep;92(9):1427-1429. doi: 10.1002/jmv.25858.
26. Banerjee AK, Blanco MR, Bruce EA, Honson DD, Chen LM, Chow A, Prashant B, Noah O, Quinodoz SA, Loney C, et al. 2020. SARS-CoV-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses. *Cell* 183: 1325–1339.e21. 10.1016/j.cell.2020.10.004
27. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol.* 2016 Sep 29;3(1):237-261. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.

28. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Dec 10;183(6):1735. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.032.
29. Gao Y, Yan L, Huang Y, Liu F, Zhao Y, Cao L, Wang T, Sun Q, Ming Z, Zhang L, Ge J, Zheng L, Zhang Y, Wang H, Zhu Y, Zhu C, Hu T, Hua T, Zhang B, Yang X, Li J, Yang H, Liu Z, Xu W, Guddat LW, Wang Q, Lou Z, Rao Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*. 2020 May 15;368(6492):779-782. doi: 10.1126/science.abb7498
30. Yang H, Xie W, Xue X, Yang K, Ma J, Liang W, Zhao Q, Zhou Z, Pei D, Ziebuhr J, Hilgenfeld R, Yuen KY, Wong L, Gao G, Chen S, Chen Z, Ma D, Bartlam M, Rao Z. Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS Biol*. 2005 Oct;3(10):e324. doi: 10.1371/journal.pbio.0030324.
31. CLUSTALW: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
32. BLASTP: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>
33. Wong, N. A., & Saier, M. H., Jr (2021). The SARS-Coronavirus Infection Cycle: A Survey of Viral Membrane Proteins, Their Functional Interactions and Pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms22031308>
34. Vargas-Alarcón G, Posadas-Sánchez R, Ramírez-Bello J. Variability in genes related to SARS-CoV-2 entry into host cells (ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11A, ELANE, and CTSL) and its potential use in association studies. *Life Sci*. 2020 Nov 1;260:118313. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118313.
35. Gierer S., Bertram S., Kaup F., Wrensch F., Heurich A., Kramer-Kuhl A. The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J. Virol*. 2013;87:5502–5511. doi: 10.1128/JVI.0012813.
36. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;181:271–280. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
37. Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D., Ren L. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun*. 2020;11:1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9
38. Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol*. 2014 Jan;88(2):1293-307. doi: 10.1128/JVI.02202-13.
39. Ulrich H, Pillat MM. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Jun;16(3):434-440.
40. UNIPROT: <https://www.uniprot.org/>
41. Onabajo OO, Banday AR, Stanifer ML, Yan W, Obajemu A, Santer DM, Florez-Vargas O, Piontkivska H, Vargas JM, Ring TJ, Kee C, Doldan P, Tyrrell DL, Mendoza JL, Boulant S, Prokunina-Olsson L. Interferons and viruses induce a novel truncated ACE2 isoform and not the full-length SARS-CoV-2 receptor. *Nat Genet*. 2020 Dec;52(12):1283-1293. doi: 10.1038/s41588-020-00731-9

42. Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, Wong SK, Huang IC, Xu K, Vasilieva N, Murakami A, He Y, Marasco WA, Guan Y, Choe H, Farzan M. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 2005 Apr 20;24(8):1634-43. doi: 10.1038/sj.emboj.7600640
43. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020 May;581(7807):215-220. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
44. BEPIPRED 2.0. <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>
45. Jaimes JA, Millet JK, Whittaker GR. Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site. *iScience.* 2020 Jun 26;23(6):101212.
46. Li, W. (2020). Delving deep into the structural aspects of a furin cleavage site inserted into the spike protein of SARS-CoV-2: A structural biophysical perspective. *Biophys. Chem.* 264, 106420. doi: 10.1016/j.bpc.2020.106420
47. Johnson, B. A., Xie, X., Kalveram, B., Lokugamage, K. G., Muruato, A., Zou, J., et al. (2020). Furin Cleavage Site Is Key to SARS-CoV-2 Pathogenesis. Preprint Server Biol. doi: 10.1101/2020.08.26.268854
48. Chiappelli F. CoViD-19 Susceptibility. *Bioinformatics.* 2020 Jul 31;16(7):501-504. doi: 10.6026/97320630016501.
49. K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, et al., The host protease TMPRSS2 plays a major role in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses, *J. Virol.* 88 (2014) 5608–5616.
50. Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., & Taguchi, F. (2010). Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *Journal of virology*, 84(24), 12658–12664.
51. Bertram S, Glowacka I, Müller MA, Lavender H, Gnirss K, Nehlmeier I, Niemeyer D, He Y, Simmons G, Drosten C, Soilleux EJ, Jahn O, Steffen I, Pöhlmann S. Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease. *J Virol.* 2011 Dec;85(24):13363-72. doi: 10.1128/JVI.05300-11.
52. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 16;102(33):11876-81. doi: 10.1073/pnas.0505577102.
53. Li Y, et al. HAb18G (CD147), a cancer-associated biomarker and its role in cancer detection. *Histopathology.* 2009;6:677–687. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03280.x.
54. Pushkarsky T, et al. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001;11:6360–6365. doi: 10.1073/pnas.111583198.
55. Bernard SC, et al. Pathogenic *Neisseria meningitidis* utilizes CD147 for vascular colonization. *Nat. Med.* 2014;7:725–731. doi: 10.1038/nm.3563.
56. Zhang MY, et al. Disrupting CD147-RAP2 interaction abrogates erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Blood.* 2018;10:1111–1121. doi: 10.1182/blood-2017-08-802918.

57. Chen Z, et al. Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Infect. Dis.* 2005;5:755–760. doi: 10.1086/427811.
58. Wang K., Chen W., Zhou Y., Lian J., Zhang Z., Du P., et al. (2020). SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. Preprint Server Biol. 10.1101/2020.03.14.988345
59. Chapple CE, Brun C. Redefining protein moonlighting. *Oncotarget* 2015;6(19):16812-3
60. Amblee V, Jeffery CJ. Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface. *PLoS One.* 2015;10(6):1-16.
61. Yoon JH, Ryu J, Baek SJ. Moonlighting activity of secreted inflammation-regulatory proteins. *Yonsei Med J.* 2018;59(4):463-9.
62. Jeffery, C. Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Phil Trans R Soc.* 2017
63. Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nat Biotechnol* 2009;27(2):157-67
64. Hoffmann, H.; Pohlmann, S. Cellular entry of the sars coronavirus. *Trends Microbiol.* 2004, 12, 466-472
65. Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature.* 2013;495(7440):251–254.
66. Willheim M., Ebner C., Baier K., Kern W. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(3):348–355.
67. Sakata-Kaneko S., Wakatsuki Y., Matsunaga Y., Usui T. Altered Th1/Th2 commitment in human CD4+ T cells with ageing. *Clin Exp Immunol.* 2000;120(2):267–273.
68. Vankadari N., Wilce J.A. Emerging WuHan (COVID-19) coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):601–604.
69. 14. Li Y., Zhang Z., Yang L., Lian X. The MERS-CoV receptor DPP4 as a candidate binding target of the SARS-CoV-2 spike. *iScience.* 2020;23(6)
70. Roncati, L., & Lusenti, B. (2020). The «moonlighting protein» able to explain the T_h1 immune lockdown in severe COVID-19. *Medical hypotheses*, 143, 110087. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110087>
71. Arisan ED, Uysal-Onganer P, Lange S. Putative Roles for Peptidylarginine Deiminases in COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 30;21(13):4662.
72. Bloch EM, Shoham S, Casadevall A, Sachais BS, Shaz B, Winters JL, van Buskirk C, Grossman BJ, Joyner M, Henderson JP, Pekosz A, Lau B, Wesolowski A, Katz L, Shan H, Auwaerter PG, Thomas D, Sullivan DJ, Paneth N, Gehrie E, Spitalnik S, Hod EA, Pollack L, Nicholson WT, Pirofski LA, Bailey JA, Tobian AA. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *J Clin Invest.* 2020 Jun 1;130(6):2757-2765.
73. D'Alessandro A, Thomas T, Dzieciatkowska M, Hill RC, Francis RO, Hudson KE, Zimring JC, Hod EA, Spitalnik SL, Hansen KC. Serum Proteomics in COVID-19 Patients: Altered Coagulation and Complement Status as a Function of IL-6 Level.

- J Proteome Res. 2020 Nov 6;19(11):4417-4427. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00365.
74. Báez-Santos, Y. M.; St John, S. E.; Mesecar, A. D. The SARS-Coronavirus Papain-like Protease: Structure, Function and Inhibition by Designed Antiviral Compounds. *Antiviral Res.* 2015, 115, 21– 38,
 75. Ziegler, C. G. K.; Allon, S. J.; Nyquist, S. K.; Mbanjo, I. M.; Miao, V. N.; Tzouanas, C. N.; Cao, Y.; Yousif, A. S.; Bals, J.; Hauser, B. M.; Feldman, J.; Muus, C.; Wadsworth, M. H.; Kazer, S. W.; Hughes, T. K.; Doran, B.; Gatter, G. J.; Vukovic, M.; Taliaferro, F.; Mead, B. E.; Guo, Z.; Wang, J. P.; Gras, D.; Plaisant, M.; Ansari, M.; Angelidis, I.; Adler, H.; Sucre, J. M. S.; Taylor, C. J.; Lin, B.; Waghray, A.; Mitsialis, V.; Dwyer, D. F.; Buchheit, K. M.; Boyce, J. A.; Barrett, N. A.; Laidlaw, T. M.; Carroll, S. L.; Colonna, L.; Tkachev, V.; Peterson, C. W.; Yu, A.; Zheng, H. B.; Gideon, H. P.; Winchell, C. G.; Lin, P. L.; Bingle, C. D.; Snapper, S. B.; Kropfski, J. A.; Theis, F. J.; Schiller, H. B.; Zaragosi, L.-E.; Barbry, P.; Leslie, A.; Kiem, H.-P.; Flynn, J. L.; Fortune, S. M.; Berger, B.; Finberg, R. W.; Kean, L. S.; Garber, M.; Schmidt, A. G.; Lingwood, D.; Shalek, A. K.; Ordovas-Montanes, J. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* 2020, 181, 1016,
 76. Liang, W.; Liang, H.; Ou, L.; Chen, B.; Chen, A.; Li, C.; Li, Y.; Guan, W.; Sang, L.; Lu, J.; Xu, Y.; Chen, G.; Guo, H.; Guo, J.; Chen, Z.; Zhao, Y.; Li, S.; Zhang, N.; Zhong, N.; He, J. Development and Validation of a Clinical Risk Score to Predict the Occurrence of Critical Illness in Hospitalized Patients With COVID-19. *JAMA Int. Med.* 2020, 180, 1081
 77. Al-Samkari H, Karp Leaf RS, Dzik WH, Carlson JCT, Fogerty AE, Waheed A, Goodarzi K, Bendapudi PK, Bornikova L, Gupta S, Leaf DE, Kuter DJ, Rosovsky RP. COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood.* 2020 Jul 23;136(4):489-500.
 78. <https://www.proteinatlas.org/>
 79. Ortiz ME, Thurman A, Pezzulo AA, Leidinger MR, Klesney-Tait JA, Karp PH, Tan P, Wohlford-Lenane C, McCray PB Jr, Meyerholz DK. Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. *EBioMedicine.* 2020 Oct;60:10297
 80. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med.* 2020 Apr;14(2):185-192. doi: 10.1007/s11684-020-0754-0.
 81. Soehnlein O., Steffens S., Hidalgo A., Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2017;17:248–261. doi: 10.1038/nri.2017.10
 82. Galani I.E., Andreakos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J. Leukoc. Biol.* 2015;98:557–564
 83. Camp J.V., Jonsson C.B. A role for neutrophils in viral respiratory disease. *Front. Immunol.* 2017;8:1. doi: 10.3389/fimmu.2017.00550.
 84. Yang S.-C., Tsai Y.-F., Pan Y.-L., Hwang T.-L. Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. *Biomed. J.* 2020 doi: 10.1016/j.bj.2020.09.001

85. Laforge M., Elbim C., Frère C., Hémadi M., Massaad C., Nuss P., Benoliel J.J., Becker C. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20:515–516.
86. Mohamed M.M.A., El-Shimy I.A., El-Shimy I.A., Hadi M.A. Neutrophil elastase inhibitors: A potential prophylactic treatment option for SARS-CoV-2-induced respiratory complications? *Crit. Care.* 2020;24:311
87. Hemmat, Nima et al. “Neutrophils, Crucial, or Harmful Immune Cells Involved in Coronavirus Infection: A Bioinformatics Study.” *Frontiers in genetics* vol. 11 641. 9 Jun. 2020, doi:10.3389/fgene.2020.00641
88. Cavalcante-Silva LHA, Carvalho DCM, Lima ÉA, Galvão JGFM, da Silva JSF, Sales-Neto JM, Rodrigues-Mascarenhas S. Neutrophils and COVID-19: The road so far. *Int Immunopharmacol.* 2021 Jan;90:107233.
89. Keidar S, Gamliel-Lazarovich A, Kaplan M, Pavlotzky E, Hamoud S, Hayek T, et al. . Mineralocorticoid receptor blocker increases angiotensin-converting enzyme 2 activity in congestive heart failure patients. *Circ Res.* (2005) 97:946–53.
90. Nie W, Yan H, Li S, Zhang Y, Yu F, Zhu W, et al. . Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol.* (2009) 46:355–61.
91. Gagnon H, Refaie S, Gagnon S, Desjardins R, Salzet M, Day R. Proprotein convertase 1/3 (PC1/3) in the rat alveolar macrophage cell line NR8383: localization, trafficking and effects on cytokine secretion. *PLoS ONE.* (2013) 8:e61557.
92. Bertram S, Glowacka I, Blazejewska P, Soilleux E, Allen P, Danisch S, et al. . TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J Virol.* (2010) 84:10016–25.
93. Abassi Z, Knaney Y, Karram T, Heyman SN. The Lung Macrophage in SARS-CoV-2 Infection: A Friend or a Foe? *Front Immunol.* 2020 Jun 5;11:1312. doi: 10.3389/fimmu.2020.01312
94. Feng Z, Diao B, Wang R, Wang G, Tan Y, et al. The novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2) directly decimates human spleens and lymph nodes. *MedRxiv*.doi:10.1101/2020.03.27.20045427
95. Sadeghi A, Tahmasebi S, Mahmood A, Kuznetsova M, Valizadeh H, Taghizadieh A, Nazemiyeh M, Aghebati-Maleki L, Jadidi-Niaragh F, Abbaspour-Aghdam S, Roshangar L, Mikaeili H, Ahmadi M. Th17 and Treg cells function in SARS-CoV2 patients compared with healthy controls. *J Cell Physiol.* 2021 Apr;236(4):2829-2839.
96. Tanaka Y., Sato Y., Sasaki T. Suppression of coronavirus replication by cyclophilin inhibitors. *Viruses.* 2013;5(5):1250–1260.
97. Olejnik P., Nuc K. Cyclophilins – proteins with many functions. *Postepy Biochem.* 2018;64(1):46–54.
98. Perlman S. Another Decade, Another Coronavirus. *N Engl J Med.* 2020;382(8):760–762
99. Liu, C., von Brunn, A., & Zhu, D. (2020). Cyclophilin A and CD147: novel therapeutic targets for the treatment of COVID-19. *Medicine in drug discovery*, 7, 100056. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100056>
100. Wan S, Yi Q, Fan S, Lv J, Zhang X, Guo L, Lang C, Xiao Q, Xiao K, Yi Z, Qiang M, Xiang J, Zhang B, Chen Y, Gao C. Relationships among lymphocyte subsets,

- cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *Br J Haematol.* 2020 May;189(3):428-437
101. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Rotola A, Rizzo R. Sars-Cov-2 Spike 1 protein control Natural killer cells activation via HLA-E/NKG2A pathway. 2020.
 102. Antonioli L, Fornai M, Pellegrini C, Blandizzi C. NKG2A and COVID-19: another brick in the wall. *Cell Mol Immunol.* 2020 Jun;17(6):672-674.
 103. Manickam, C., Sugawara, S., & Reeves, R. K. (2020). Friends or foes? The knowns and unknowns of natural killer cell biology in COVID-19 and other coronaviruses in July 2020. *PLoS pathogens*, 16(8).
 104. Zhang H, Zhou P, Wei Y, et al. Histothologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann Intern Med* Epub ahead of print 12 March 2020.
 105. Gentile, F., Aimo, A., Forfori, F., Catapano, G., Clemente, A., Cademartiri, F., Emdin, M., & Giannoni, A. (2020). COVID-19 and risk of pulmonary fibrosis: the importance of planning ahead. *European journal of preventive cardiology*, 27(13), 1442–1446. <https://doi.org/10.1177/2047487320932695>
 106. Zhao X, Nicholls JM, Chen YG. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus nucleocapsid protein interacts with Smad3 and modulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2008 Feb 8;283(6):3272-3280.
 107. Zuo W, Zhao X, Chen YG SARS coronavirus and lung fibrosis In: Lal S. (ed.) *Molecular biology of the SARS-coronavirus.* Berlin and Heidelberg: Springer, 2010, pp.247–258
 108. Ferreira-Gomes, M., Kruglov, A., Durek, P., Heinrich, F., Tizian, C., Heinz, G. A., Pascual-Reguant, A., Du, W., Mothes, R., Fan, C., Frischbutter, S., Habenicht, K., Budzinski, L., Ninnemann, J., Jani, P. K., Guerra, G. M., Lehmann, K., Matz, M., Ostendorf, L., Heiberger, L., ... Mashreghi, M. F. (2021). SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF- β -dominated chronic immune response that does not target itself. *Nature communications*, 12(1), 1961. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22210-3>
 109. Hoehl, S. et al. Evidence of SARS-CoV-2 infection in returning travelers from Wuhan, China. *N. Engl. J. Med.* 382, 1278–1280 (2020).
 110. Klann, K., Tascher, G. & Münch, C. Functional translome proteomics reveal converging and dose-dependent regulation by mTORC1 and eIF2 α . *Mol. Cell* 77, 913–925 (2020).
 111. Bojkova D, Klann K, Koch B, Widera M, Krause D, Ciesek S, Cinatl J, Münch C. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature.* 2020 Jul;583(7816):469-472. doi: 10.1038/s41586-020-2332-7.
 112. Zecha J, Lee CY, Bayer FP, Meng C, Grass V, Zerweck J, Schnatbaum K, Michler T, Pichlmair A, Ludwig C, Kuster B. Data, Reagents, Assays and Merits of Proteomics for SARS-CoV-2 Research and Testing. *Mol Cell Proteomics.* 2020 Sep;19(9):1503-1522. doi: 10.1074/mcp.RA120.002164.
 113. Gordon, D.E., Jang, G.M., Bouhaddou, M. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* 583, 459–468 (2020).

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA PERO NO CITADA

1. Whetton AD, Preston GW, Abubeker S, Geifman N. Proteomics and Informatics for Understanding Phases and Identifying Biomarkers in COVID-19 Disease. *J Proteome Res.* 2020 Nov 6;19(11):4219-4232. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00326.
2. Alguwaizani S, Park B, Zhou X, Huang DS, Han K. Predicting Interactions between Virus and Host Proteins Using Repeat Patterns and Composition of Amino Acids. *J Healthc Eng.* 2018 May 9;2018:1391265. doi: 10.1155/2018/1391265.
3. Haas P, Muralidharan M, Krogan NJ, Kaake RM, Hüttenhain R. Proteomic Approaches to Study SARS-CoV-2 Biology and COVID-19 Pathology. *J Proteome Res.* 2021 Feb 5;20(2):1133-1152. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00764.

9. ANEXOS

ANEXO 1.- ALINEAMIENTO MULTIPLE SECUENCIAL DE LA PROTEÍNA S SPIKE DE LOS 3 CORONAVIRUS

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment SPIKE PROTEINS

MERS	MIHSVFLLMFLLTPTESYVDVGPDSVKSACIEVDIQTFDFDKTWPRP-IDVSKADGIIYP	59
SARS-CoV2	----MFVFLVLLPLV-S-----SQCVN--LTT--RTQLPPAY--TNSFTRGVVYP	39
SARS-CoV	----MFIFLLFLTLT-S-----GSDL--RCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYP	43
	:*:::.* . * . : : * * **	
MERS	QGRYTSNITITYQGLF-PYQGDHGMVYVSAGHATGTTTPQKLFVANYSQDVKQFANGFVV	118
SARS-CoV2	DKVFRSSVLHSTQDLFLPFSSNVT--WFHAIHVSGTNGTKR----FDNPVLPFNDGVVYF	92
SARS-CoV	DEIFRSDTLYLTDLFLPFYSNVT---GFHTIN-----HT----FGNPVLPFKDGIYF	89
	: * . * . ** * : : : : : : : : * * : . .	
MERS	RIGAAANSTGTVIISPSTSATIRKIYPAFMLGSSVGNFSDGKMGRFFNHTLVLLPDGCGT	178
SARS-CoV2	ASTE-----KSNIRGWIFGTTLDSTQ-----SLLIVNNTATNV	126
SARS-CoV	AATE-----KSNVVRGWVFGSTMNKSQ-----SVIIINNSTNV	123
	: : : : * : : : : : : : : : : : . .	
MERS	LLRAF--YCILEPRSGNHCPAGNSYTSFATYHTPATDCSDGNYNRNASLNSFKEYFNLRN	236
SARS-CoV2	VIKVCFCNDPFLGVVYHKNN-----KSWMESEFRVYSSANN	165
SARS-CoV	VIRACNFELCDNPFVAVSKPMGT-----QTHTMIFDNAFN	158
	: : . : * : . * .	
MERS	CTFMYTYNITEDEILEWFGITQTAQG-VHLFSSRYVDLYGGN-----MFQ	280
SARS-CoV2	CTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEP	225
SARS-CoV	CTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFVYVYQPIDVVRDLPVSGFNTLKP	218
	*** * : : : * : : * . . : * : :	
MERS	FATLPVYDTIKYYSIIPHSIR---SIQSDRKAW----AAFVYVKLQPLTFLLDVSDGYI	333
SARS-CoV2	LVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTI	285
SARS-CoV	IFKLPLGINITNFRAILTAFS-----PAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGTI	272
	: ** : * . : : : . * ** : * * * : * . . : * *	
MERS	RRADICGFNDLSQLHCSYESFDVESGVYSVSSFEAKPSGVSVEQAEG-VECDFSPLLSG-	391
SARS-CoV2	TDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNAT	345
SARS-CoV	TDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPVSGDVVRFNITNLCPFGEVFNAT	332
	* : * . : * : : * : : * : : * . * . * . * . * . : * * . : . .	
MERS	TPPQVYNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPLS	451
SARS-CoV2	RFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCFNTVYADSFVIRGD	405
SARS-CoV	KFPSVYAWERKKISNCVADYSVLVNSTFFSTFKCYGVSATKLNLDLCSNVYADSFVVKGD	392
	. ** : * : * : : * . . * . * * : * : : . * : : : * * .	
MERS	MKSDLVSSAGPISQFNYSFNSPTCLILATVPHNLTITKPLKYSYINKCSRLLSDDR	511
SARS-CoV2	EVRIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRLFRKSNLKPFE	465
SARS-CoV	DVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVYNYRYRLRHGKLRPFE	452
	: : . : * * : : * * . * : : . : : . * * * .	
MERS	TEVPQLVNANQYSPCVSIVPST-VWEDGDYRQKLSPLEGGWLVASGSTVAMTEQLQMG	570
SARS-CoV2	RDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYF-----PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVL	514
SARS-CoV	RDISNVVFPSPDGKPCPT-PALNCYW-----PLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVVL	500
	: : . * * . : : * : : * : : * : : * . : : .	
MERS	FGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQLGNCVEYSLYGVSGRGVFNCTAVGVRQRF	630
SARS-CoV2	FELL----HAPATVCGP-----KKSTNLVKNKCVNFNFLGTGTGVLTESNKKFLPFQF	565
SARS-CoV	FELL----NAPATVCGP-----KLSTDLIKNQCVNFNFLGTGTGVLTSSKRFPFQF	551
	* : : * * . . . : * : : * : * * : . . * : *	

MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	VYDAYQNLVGYSD--DGNYYCLRACVSVVSVIYD--KETKTHATLFGSVACEHISSTM GRDIADTT-DAVRDPQTLLEILDITPCSFGGVSUITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAI GRDVSDFD-DSVRDPKTSEILDISPCAFGGVSUITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVS * : . * : : * **** : : . * . : * * . : : :	686 624 610
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	SQYSRSTRSMLKRRDSTYGPLQTPVGCVLGLVNSSLFVEDCKLPLGQSLCALPDTPTSTLT HADQLT--PTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVN-NSYECDIPIGAGICASYQTQT-NS HADQLT--PAWRIYSTGNVVFQTAGCLIGAEHVD-TSYECDIPIGAGICASYHTVS-L- . : : : : * . : : . : : * . : : * . : : *	746 680 665
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	PRSVRSVPGEMRLASIAFNHPHPIQV-DQLNSSFYKLSIPTNFSFGVTQEYIQTIIQKVTVD PRRARSVASQSI---IAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVD ---LRSTSQKSI---VAYTMSLGAENSVAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMKTSVD * . : : : * . : . . : * . : : * * * * : : : * . : : * . : : *	805 737 719
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	CKQYVCGFQKCEQLLREYGFQCSKINQALHGANLQQDDSVRNLFSVKKSSQSSPIIPGF CTMYICGDSTECNLQLQYGSFCTQNLRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKKQYKTPPIKDF CNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQNLRALSGIAAEQDRNTREVFQVKKQYKTPPLKDF * . * * . . : * : * * * * * : : * * * * * * : * . * : : * : * . : * :	865 797 779
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	GGDFNLTLLPEVSISTGSRARSIEDLLFDKVTIADPGYMQGYDDCMQGPASARDLIC GGF-NFSQILPDP---SKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCL--GDIAARDLIC GGF-NFSQILPDP---LKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECL--GDINARDLIC * * * : : * : : * * * * * * * : : * * : * : * * * * * *	925 851 833
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	AQYVAGYKVLPLMDVNMEAAAYTSLLGSIAGVGTAGLSSFAAIPFAQSFYRLNGVGI AQKFNGLTVLPPLLDDEIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV AQKFNGLTVLPPLLDDEIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV * * . * . * * * * : * * * * * : : . . * * * * . : * * * * . : * * * * * :	985 911 893
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	TQQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTFG TQNVLYENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTFG TQNVLYENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFQKVQDAVNNNAQALSKLASELSNTFG * * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * *	1045 971 953
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	AISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTTLNFAVQAQLVRSASAALSQAQLAKDKVNE AISSVNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE AISSVNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE * * * : . * * * * * * : * : . * * * * * * * * : * * * * * * * * . * * * * * * * :	1105 1031 1013
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	CVKAQSKRSGFCGQTHIVSFVVPNAPGLYFHMVGYPPSNHIEVVSAYGLCDAANPTNCI CVLQSKRVDFCGKGYHLMSFQSAAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFHTAPAIICHDGKA---H CVLQSKRVDFCGKGYHLMSFQAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAIICHDGKA---Y * * . * * * * . * * * * * * * : * * * * * * * * : * * * * . : * * . : . :	1165 1088 1070
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	APVNGYFIKTNNTRIVDEWSTYGSFYAPEPITSLNNTKYVAPQVYQYQ-ISTNLPPLLG FPREGVFVSN-----GTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQ- FPREGVFVFN-----GTSWFIQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQ- * : * * : . : * * . * : * : * * * * . . . : * : * * * * * :	1224 1142 1124
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	NSTGIDFQDELDEFFKNVSTSIPTNFGSLTQINTLLDLTYEMLSQVVVAKLINESYIDLK -PELDSFKEELDKYFNHTSPDVLGDISGINASVVIQKEIDRLNEVAKLNESLIDLQ -PELDSFKEELDKYFNHTSPDVLGDISGINASVVIQKEIDRLNEVAKLNESLIDLQ . * : * * * : * * * : : * * : : * * : : : * : * : * * * * * * * * :	1284 1201 1183
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	ELGNYTYINKWPWYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCTGCGTNCMGKLCNRCDDRYEEYD ELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCSCLGACCSCCKF-DEDD ELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCSCLGACSCGSCCKF-DEDD * * * : * * * * * * * * * * * : : : * * . * : * * . * . . * * : * * * :	1344 1260 1242
MERS SARS-CoV2 SARS-CoV	LEPHKVHVH---- 1353 SEPVKGVKLYH 1273 SEPVKGVKLYH 1255 * * * :	1353 1273 1255

ANEXO 2.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE SECUENCIAL DEL FRAGMENTO S2 DE LA PROTEÍNA S SPIKE DE LOS 3 CORONAVIRUS

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MERS	RSVRSVPGEMRLASIAFNHPIQV-DQLNSSYFKLSIPTNFSFGVTQEYIQTTIQKVTVDC	59
SARS-COV2	----SV---ASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTTEILPVSMTKTSVDC	53
SARS-COV	----ST---SQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMKTSVDC	53
	*. : : * . : . . . : * . : : : : : : * * : . : : * . : : * * *	
MERS	KQYVCNGFQKCEQLLREYQGFCSKINQALHGANLRQDDSVRNLFASVKSSQSSPIIPGFG	119
SARS-COV2	TMYICGDSTECNLLQLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFG	113
SARS-COV	NMYICGDSTECANLLQLQYGSFCTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFG	113
	. * : * . . : * : * * : * . : : : * : * * * . * * . . : : * * . * : * *	
MERS	GDFNLTLEPVSISTGSRARSIAIEDLLDFDKVTIADPGYMQGYDDCMQQGPASARDLICA	179
SARS-COV2	GF-NFSQILPDP---SKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCL--GDIAARDLICA	167
SARS-COV	GF-NFSQILPDP---LKPTRKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECL--GDINARDLICA	167
	* * : : : * . : * * * : : : * : * * * : : * : * : * * * * * * * * * * *	
MERS	QYVAGYKVLPLMDVNMEAAAYTSSLLGSIAGVGTAGLSSFAAIPFAQSIFYRLNGVGIT	239
SARS-COV2	QKFNGLTVLPPLTDEMIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVT	227
SARS-COV	QKFNGLTVLPPLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVT	227
	* . * . * : * * : * * * * : * : . . * * * * . : * * * * . : * : * : * : * *	
MERS	QQVLSENQKLIANKFNQALGAMQTGFTTTNEAFRKVQDAVNNAQALSKLASELSNTFGA	299
SARS-COV2	QNVLYENQKLIANQFNQAIQKIQDLSLSTASALGKLDVVNNAQALNTLVKQLSSNFGA	287
SARS-COV	QNVLYENQKLIANQFNKAIQKIQESLTTTSTALGKLDVVNNAQALNTLVKQLSSNFGA	287
	* : * * * * * * * : * * * : * : . . * : : : * * : * : * * * : * * * * * * * * *	
MERS	ISASIGDIIQRLDVLEQDAQIDRLINGRLTTLNLFVAQQLVRSASAALSQAQAKDKVNEC	359
SARS-COV2	ISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSEC	347
SARS-COV	ISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSEC	347
	* * : . * * : * * * * * * * * * * : * : : : * * : * : . * * : * * * * * * *	
MERS	VKAQSKRSGFCGQGTHIVSFVFNAPNGLYFMHVGYPVSNHIEVVSAYGLCDAANTNCIA	419
SARS-COV2	VLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQASAPHGTVVFLHVTVVPAQEKNTTAPAICHGDKA---HF	404
SARS-COV	VLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQAAPHGTVVFLHVTVVPSQERNFTTAPAICHEGKA---YF	404
	* . * * * * . * * : * * * * * * : * * * * * * * * * . . . : * * . * * . *	
MERS	PVNGYFIKTNTRIVDEWYSYTGSSFYAPEPITSLNTKYVAPHVTVYQN-ISTNLPPPLGN	478
SARS-COV2	PREGVFN-----GTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGVNNTVYDPLQ--	457
SARS-COV	PREGVFN-----GTSWFITQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQ--	457
	* : * * : . * * . * : * * : * * * * * . . . : : : : * * *	
MERS	STGIDFQDELDEFFKNVSTSIIPNFGSLTQINTLLDLTYEMLSLQVVKALNESYIDLKE	538
SARS-COV2	PELDSFKEELDKYFNKHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE	517
SARS-COV	PELDSFKEELDKYFNKHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE	517
	. * : : * * : : * * * * : : : * : * : * : * * * * * * * * * * * * *	
MERS	LGNYTYNKWPWYIWLGFIAGLVALALCVFFILCCTGCGTNCMGKLCNRCCDRYEEYDL	598
SARS-COV2	LGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCCLKGCSCGSCCKF-DEDDS	576
SARS-COV	LGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCCLKGCSCGSCCKF-DEDDS	576
	* * : * * * * * * * * * * * * * : : : * * * * : * . * . * * . * * *	
MERS	EPHKVHVH----	606
SARS-COV2	EPVLKGVKLHYT	588
SARS-COV	EPVLKGVKLHYT	588
	** * :	

ANEXO 3.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE SECUENCIAL DE LA REGIÓN RBD (RECEPTOR BINDING DOMAIN) DE LA PROTEÍNA S SPIKE DE LOS 3 CORONAVIRUS

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

MERS          EAKPSGSVVEQAE-GVECDFSPLLSG-TPPQVYNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFT      58
SARS-COV2     RVQPTEIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFK      60
SARS-COV      RRVVSGDVVRFNITNLCPFGEVFNATKFPVSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFK      60
               .. *: .:*. : * *. :... .** :*: :*: : : * . .. *.

MERS          CSQISPAAIASNCYSSLILDYFSYPLSMKSDLSVSSAGPISQFNYKQSFNSPTCLILATV      118
SARS-COV2     CYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVROIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNS      120
SARS-COV      CYGVSATKLNLDLCSNVYADSFVVKGDDVROIAPGQTVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNT      120
               * :* : : . *::: * * . ::: :*: *:::*** . *:: .

MERS          PHNLTITKPLKYSYINKCSRFLSDDRTEVPQLVNAVQYSPCVSIVPST-VWEDGDYYRK      177
SARS-COV2     NNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYF-----      172
SARS-COV      RNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFSPDGKPTP-PALNCYW-----      171
               : :. :* * * . : : .** . :

MERS          QLSPLEGGGWLVASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKLEFANDTKIASQLGNC      237
SARS-COV2     ---PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELL----HAPATVCGPKK----STNLVKKNC      220
SARS-COV      ---PLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELL----NAPATVCGPKL----STDLIKNOQ      219
               **: . *: :.* . : :.* : :** . . :.*

MERS          VEY          240
SARS-COV2     VNF          223
SARS-COV      VNF          222
               *::

```

ANEXO 4.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE SECUENCIAL DE LA RNA POLIMERASA DE LOS 3 CORONAVIRUS

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MERS	-SKDSNFLKRVRSIVNARIEPCSSGLSTDVVFRAFDCNYKAKVAGIGKYYKTNTCRFV	59
SARS-COV2	SADAQSFLNRVCG-VSAARLTPCGTGTSTDVVYRAFDIY--NDKVAGFAKFLKTNCCRFQ	57
SARS-COV	SADASTFLNRVCG-VSAARLTPCGTGTSTDVVYRAFDIY--NEKVAGFAKFLKTNCCRFQ	57
	:. ..**:* * : ** : ** : * ***** : ***** : ***** : ** * **	
MERS	ELDDQGHLLDSYFVVKRHTMENYELEKHICYDLLRDCDAVAPHDFFIQDVVKVKTPIVIRQ	119
SARS-COV2	EKDEDDNLIDSYFVVKRHTFSNYQHEETIYNLLKDCPAVAKHDFKFRIDGDMVPHISRQ	117
SARS-COV	EKDEGNLLDSYFVVKRHTMSNYQHEETIYNLVKDCPAVAVHDFKFRVDGDMVPHISRQ	117
	* * : : : ***** : ** : * : * : : ** * ** * ** * * : * . * ** **	
MERS	RLTEYTMMDLVYALRHFQDN-SEVLKAILVKYGCCDVTYFENKLWFDVFNPSVIGVYHK	178
SARS-COV2	RLTKYTMADLVYALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKKDWYDFVENPDILRVYAN	177
SARS-COV	RLTKYTMADLVYALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKKDWYDFVENPDILRVYAN	177
	*** : ** ***** : . . : * ** * . * ** * * : : * * : ***** : : * * :	
MERS	LGERVRQAILNVTVKFCDHMVKAGLVGLTLDNQDLNGKWDYDFGDFVITQPGSGVAIVDSY	238
SARS-COV2	LGERVRQALLKTQVQCDAMRNAGIVGLTLDNQDLNGNWDYDFGDFIQTPGSGVPPVDSY	237
SARS-COV	LGERVRQSLKTQVQCDAMRDAGIVGLTLDNQDLNGNWDYDFGDFVQVAPGCGVPIVDSY	237
	***** : : * : * : * * * . * : ***** : ***** : . * * . * : ****	
MERS	YSYLMFVLSMTDCLAETHRDCDFNKPLIEWPLTEYDFTDYKQVLFKDYKQVDFQTYHAN	298
SARS-COV2	YSLLMPILTLTRALTAESHVDTDLTKPYIKWDLKDYDFTEERLKLFDYFYKQVDFQTYHPN	297
SARS-COV	YSLLMPILTLTRALAAESHMDADLAKPLIKWDLKDYDFTEERLCLFDYFYKQVDFQTYHPN	297
	** * * : : * * . * : * * * * * : * * * * * : * * : * * : ***** * *	
MERS	CVNCTDDRCVLHCANFNVLVFAMTMPKTCFGPIVRKIFVDGVPFVVSFCGYHYKELGLVMNM	358
SARS-COV2	CVNCLDDRCILHCANFNVLVSTVFPPTSFGLVVRKIFVDGVPFVVSFGYHFRELGVVHNQ	357
SARS-COV	CINCLDDRCILHCANFNVLVSTVFPPTSFGLVVRKIFVDGVPFVVSFGYHFRELGVVHNQ	357
	* : * * ***** : ***** : . : * * . * : ***** : ***** : * * : * * : *	
MERS	DVSLHRHRLSLKELMMYAADPAMHIASNAFLDLRTSCFSVAALTTGLTFQTVRPGNFNQ	418
SARS-COV2	DVNLHSSRLSPKELLVYAADPAMHAASGNLLLDKRTTCFSVAALTNNVAFQTVKPGNFNK	417
SARS-COV	DVNLHSSRLSPKELLVYAADPAMHAASGNLLLDKRTTCFSVAALTNNVAFQTVKPGNFNK	417
	** . * * * * : * * : : ***** * * . * : * * * : ***** . . : * * : ***** :	
MERS	DFYDFVVSCKGFFKEGSSVTLKHFFFAQDGNAAITDYNYSYNLPTMCDIKQMLFCMEVVN	478
SARS-COV2	DFYDFAVSKGFFKEGSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYRYRNLPMTCDIRQLLFVVEVVD	477
SARS-COV	DFYDFAVSKGFFKEGSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYRYRNLPMTCDIRQLLFVVEVVD	477
	***** . ***** ***** : * : * * ***** : * : * * : * * :	
MERS	KYFEIYDGGCLNASEVVVNNLDKSAGHPFNKFGKARVYYESMSYQEQDELFAATKRNVIP	538
SARS-COV2	KYFDCYDGGCINANQVI VNNLDKSAGFPFNKWKARLYYDSMSYEDQDALFAYTKRNVIP	537
SARS-COV	KYFDCYDGGCINANQVI VNNLDKSAGFPFNKWKARLYYDSMSYEDQDALFAYTKRNVIP	537
	*** : ***** : * . : : ***** . ***** : ***** : * : ***** : * * * *****	
MERS	TMTQMNLYAISAKNRARTVAGVSI LSTMTNRQYHQKMLKSMAATRGTATVIGTTFKGYGG	598
SARS-COV2	TITQMNLYAISAKNRARTVAGVSI CSTMTNRQYHQKLLKSI AATRGTATVIGTTFKGYGG	597
SARS-COV	TITQMNLYAISAKNRARTVAGVSI CSTMTNRQYHQKLLKSI AATRGTATVIGTTFKGYGG	597
	* : ***** : ***** : * * : * * : ***** * * : *****	

MERS	WDFMLKTLKVDNPHLMGWDYPKCDRAMPNCRIFASLILARKHGTCTTRDRFYRLAN	658
SARS-COV2	WHNMLKTVYSDEVNPHLMGWDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLARKHTTCCSLSHRFYRLAN	657
SARS-COV	WHNMLKTVYSDEVTPHLMGWDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLARKHNTCCNLSHRFYRLAN	657
	*. ****:.*:*. ***** **:*:**** * . *****	
MERS	ECAQVLSEYVLCGGGYVVKPGGTSSGDATTAYANSVFNILQATTANVSALMGANGNKIVD	718
SARS-COV2	ECAQVLSVMVMCGGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQAVTANVNALLSTDGNKIAD	717
SARS-COV	ECAQVLSVMVMCGGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQAVTANVNALLSTDGNKIAD	717
	***** *:***. ***** **.***.*:.*:****.*	
MERS	KEVKDMQFDLYVNVYRSTSPDPKFDKYYAFLNKHFSMMILSDDGVVVCYNSDYAAKGYIA	778
SARS-COV2	KYVRNLQHRLYECLYRNRDVTDFVNEFYAYLRKHFSMMILSDDAVVCFNSTYASQGLVA	777
SARS-COV	KYVRNLQHRLYECLYRNRDVEHEFVDFEYAYLRKHFSMMILSDDAVVVCYNSNYAAQGLVA	777
	* *:::*. ** :*. . * .*::::*. *****.***:** **::: *	
MERS	GIQNFKETLYYQNNVFMSEAKCWETDLKKGPHFCSQHTLYIKDGGDGYFLPYDPSRI	838
SARS-COV2	SIKNFKSVLYYQNNVFMSEAKCWETDLTKGPHFCSQHTMLVKQDDYVYLPYDPSRI	837
SARS-COV	SIKNFKAVLYYQNNVFMSEAKCWETDLTKGPHFCSQHTMLVKQDDYVYLPYDPSRI	837
	.*:*** .*****.****.*****: :*:*** :*****	
MERS	LSAGCFVDDIVKTDGTLMVERFVSLAIDAYPLTKHEDIEYQNVFWVYLQYIEKLYKDLTG	898
SARS-COV2	LGAGCFVDDIVKTDGTLMIERFVSLAIDAYPLTKHPNQEYADVFLYLQYIRKLHDELGTG	897
SARS-COV	LGAGCFVDDIVKTDGTLMIERFVSLAIDAYPLTKHPNQEYADVFLYLQYIRKLHDELGTG	897
	*.*****:***** : ** **:*****.*:.*:***	
MERS	HMLDSYSVMLCGDNSAKFWEEAFYRDLYSSPTLQ	933
SARS-COV2	HMLDMYSVMLTNDNTSRYWEPEFYEAMYTPHTVLQ	932
SARS-COV	HMLDMYSVMLTNDNTSRYWEPEFYEAMYTPHTVLQ	932
	*** ***** .*::::*** ** .*: *.**	

ANEXO 5.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE SECUENCIAL DE LAS PROTEASAS VIRALES

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MERS	SGLVKMSHPSGDVEACMVQVTCGSMTLNGLWLDNTVWCPRHVMCPADQLSDPNYDALLIS	60
SARS-COV2	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTNGLWLDVVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIR	60
SARS-COV	SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTNGLWLDVTVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLIR	60
	** :*:***.*.*****: *****.*:*****: * :::: :***: **	
MERS	MTNHSFSVQKHIGAPANLRVVGHAMQGTLLKLTVDVANPSTPAYTFTTVKPGAASFVLAC	120
SARS-COV2	KSNHNFVQA---GNVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTANPKTPKYFVRIQPGQTFVSLAC	117
SARS-COV	KSNHSFLVQA---GNVQLRVIGHSMQNCVLLKLVDTSNPKTPKYFVRIQPGQTFVSLAC	117
	:**.* ** . :*:***:*. :*:.*.:.***.*.*. :*: :*****	
MERS	YNGRPTGFTTVMRPNYTIKGSFLGSCGSGVYTKEGSVINFCYMHQMELANGTHTGSAF	180
SARS-COV2	YNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCGSGVFNIDYDCVSFCYMHMELPTGVHAGTDL	177
SARS-COV	YNGSPSGVYQCAMRPNHTIKGSFLNGSCGSGVFNIDYDCVSFCYMHMELPTGVHAGTDL	177
	*** *:*. : .*****.***** *****: . : . :*****:*** .*:*: : :	
MERS	DGTYMGAFMDKQVHQVQLTDKYCSVNVVAVLYAAAILNGCAWFVKPNRTSVVSNFNEWALAN	240
SARS-COV2	EGNFYGFVDRQTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY	237
SARS-COV	EGKFYGFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKY	237
	:*:* ** *:*. * . ** . :*:*****:*** ** : : *:* .** *	
MERS	QFTEFVGTQ--SVDMLAVKTGVAIEQLLYAI-QQLYTGFOGKQILGSTMLEDEFTPEDVN	297
SARS-COV2	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTPFVNV	297
SARS-COV	NYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTPFVNV	297
	: : . : . :*::***: : : : * .*:*: : *****:***** **	
MERS	MQIMGVVMQ	306
SARS-COV2	RQCSGVTFQ	306
SARS-COV	RQCSGVTFQ	306
	* ** .**	